



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2017

**Ana Rita Sousa
Circuncisão**

**Análise do perfil nutricional de *Ulva rigida* cultivada
sob diferentes condições em sistema de aquacultura
integrada multi-trófica**



Ana Rita Sousa
Circuncisão

Análise do perfil nutricional de *Ulva rigida* cultivada sob diferentes condições em sistema de aquacultura integrada multi-trófica

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Maria Cardoso, Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor Artur Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Helena Abreu, Cofundadora e Diretora de Investigação da ALGAplus, Lda.

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA e ao grupo ReSyNa pela FCT, União Europeia, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE)

Projeto de investigação e desenvolvimento tecnológico em copromoção POCI-01-0247-FEDER-003419, SHARP - Seaweed for Healthier Traditional Products, cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Temático Competitividade e Internacionalização, no âmbito do Programa “Portugal 2020”.



o júri

presidente

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

Professor associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Sofia Pereira Moreira

Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Doutora Susana Maria Cardoso e ao meu coorientador Professor Doutor Artur Silva pelo apoio, conselhos, motivação, orientação e conhecimento transmitido ao longo deste ano.

Agradeço à minha orientadora de Estágio Doutora Helena Abreu pelos conselhos, orientação e conhecimento transmitido ao longo deste ano. Agradeço igualmente à empresa ALGAplus, Lda, em particular, ao Doutor Rui Pereira e ao Pedro todo o apoio e disponibilidade prestado ao longo do estágio.

Agradeço ao Professor Doutor Manuel António Coimbra e à Doutora Cláudia Nunes pelo apoio, orientação e conhecimento transmitido ao longo deste ano.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, nomeadamente, à Ana Sofia Queirós, Rodrigo Neto, Marcelo Catarino, Pedro Fernandes, Sónia Ferreira, Mónica Válega, Valentina, Catarina e Andreia por todo o apoio prestado, companheirismo e paciência!

Agradeço aos meus amigos, aos meus pais e à restante minha família pela paciência e força dada ao longo deste ano. Obrigado!

Agradeço, particularmente, a ti Diogo por nunca me teres deixado desistir e pelas tuas palavras de carinho e conforto que tanto ajudaram! Obrigado!

Obrigado a todos que direta e indiretamente me acompanharam neste longo percurso.

palavras-chave

Ulva rigida, IMTA, macroalgas, valor nutricional, proteína, amido, ulvanas, sazonalidade

resumo

Recentemente, tem surgido um elevado interesse na utilização comercial das macroalgas, sobretudo no setor alimentar, devido aos seus constituintes que na maioria exibem múltiplas bioatividades benéficas para a saúde. A *Ulva rigida* é uma macroalga verde, cosmopolita, capaz de se adaptar a uma vasta gama de condições ambientais, tornando a sua reprodução possível ao longo de todo o ano. Desta forma, torna-se uma espécie promissora de ser integrada num sistema de IMTA (aquacultura integrada multi-trófica) onde geralmente ocorre a manipulação de condições de cultivo com vista à alteração do valor nutricional das macroalgas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação de diferentes parâmetros nutricionais na *Ulva rigida* cultivada sob diferentes condições em dois desenhos experimentais diferentes, em sistema de IMTA. Para o primeiro desenho experimental, foram estabelecidas diferentes Densidades de Cultivo (DC) e Taxas de Renovação do meio de cultivo (TR) avaliadas em dois períodos sazonais diferentes. Os resultados permitiram concluir que a DC influenciou positivamente o teor de cinzas entre as diferentes condições atingindo na condição com menor DC e TR cerca de 38 % bs (base seca) em setembro. Analogamente, o teor de proteína foi influenciado pela TR, verificando um aumento do teor de médio deste parâmetro de setembro para janeiro (atingindo os 23,5 % bs) devido à maior disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo induzido pela maior TR e pela sazonalidade. Para o segundo desenho experimental, foram estabelecidas diferentes DC e utilizados dois tipos de água de cultivo (nova e velha) de modo a avaliar, principalmente, o perfil de hidratos de carbono da *Ulva rigida* ao longo de três semanas. Os resultados evidenciaram que as condições de cultivo não influenciaram o teor de humidade, resíduo sólido e cinzas, no entanto foi registado uma diminuição do teor de proteína (de 18 para 7% bs), para as diferentes condições, ao longo do tempo. Em contrapartida, a análise de açúcares realizada ao Resíduo Insolúvel em Álcool (AIR) evidenciou que a *Ulva rigida* é constituída por Rha (7-8 % m/m), Xyl (2-3 % m/m) e UA (ácidos urónicos) (18-23% m/m), associados à presença de ulvanas, que se mantêm, praticamente inalterados entre as diferentes condições, ao longo do tempo. Contudo, foi verificado um aumento do teor de Glc (10-27 % m/m), da razão Glc/Rha e do teor total polissacarídeos do AIR, entre as diferentes condições de cultivo, ao longo do tempo, associado possivelmente à presença de amido. Adicionalmente, foram estudadas as ligações glicosídicas presentes num extrato de ulvanas, com vista à identificação da posição dos grupos sulfato tendo-se verificado, por dessulfatação, o aumento da ligação 4-Xyl e da 3,4-Rha, possivelmente indicativas da di-substituição por sulfatos no C-2 e C-3 da Xyl e Rha, estando esta última especialmente sulfatada no C-2. Assim, este trabalho permitiu concluir que a manipulação de diferentes condições de cultivo num sistema de IMTA pode induzir alterações específicas na composição físico-química da *Ulva rigida*, melhorando o seu valor nutricional e rentabilidade no mercado.

keywords

Ulva rigida, IMTA, macroalgae, nutritional value, protein, starch, ulvans, seasonality

abstract

Recently, there has been an increasing interest in the commercial use of seaweeds, mainly in the food industry, due to their chemical compounds, which can exhibit multiple bioactive health effects. The *Ulva rigida* is a green macroalgae, cosmopolitan, and its tolerance to a high range of environmental conditions making reproduction possible throughout the year. Thus, this is a promising species to be integrated in the IMTA (Integrated Multi-Trophic Aquaculture) system, where the modulation of growth conditions are established in order to change the nutritional value of macroalgae. In this context, the aim of this work consisted in the evaluation of different nutritional parameters in *Ulva rigida*, cultivated under different conditions in two different experimental designs in an IMTA system. For the first experimental design, different stocking density (SD) and nutrient flow rate (NFR) were evaluated in two different seasonal periods. By this way, it was observed that the stocking density positively influenced the ash content between the different conditions, reaching about 38 % DM (dry matter) in september under the condition with lower DC and NFR. Similarly, the protein content was influenced by nutrient flow rate observed by an increase in the mean content of this parameter from September to January (reaching about 23,5 % DM), mainly due to the higher availability of nutrients in the medium, induced by the higher nutrient flow rate and seasonality. For the second experimental design, different SD and water types were implemented in order to mainly evaluate the carbohydrate profile of *Ulva rigida* over three weeks. The results showed that the cultivation conditions did not influence the moisture content, solid residue and ashes, however, a decrease of the protein content (from 18 to 7 % DM) was observed over time for the different conditions. In contrast, the sugar analysis performed on the AIR showed that the *Ulva rigida* was composed by Rha (7-8% m/m), Xyl (2-3 % m/m) and UA (18-23% m/m), associated to the presence of ulvans, which remained practically unchanged between the different conditions over time. However, an increase in the content of Glc (10-27 % m/m), Glc/Rha ratio and total AIR Polysaccharides, among the different conditions, over time, it was associated to the presence of starch. In addition, the glycosidic linkages present in an ulvans's extract were studied in order to identify the position of the sulfate groups. The increase of the 4-Xyl and 3,4-Rha linkages indicate the existence of di-substitution by sulfates at C-2 and C-3 of Xyl and Rha, the later being specially sulfated at C-2. Thus, the manipulation of different cultivation conditions in an IMTA system induced a change in the physical-chemical composition of *Ulva rigida*, improving not only its nutritional value but also its profitability in the market.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALGAplus, Lda – Estágio curricular	3
1.2. Contextualização.....	4
1.3. Tipos de macroalgas	5
1.4. Composição nutricional das macroalgas.....	6
1.4.1. Proteínas e aminoácidos	7
1.4.2. Hidratos de carbono e fibra dietética	9
1.4.3. Lípidos	10
1.4.4. Minerais e vitaminas.....	11
1.5. Influência dos fatores abióticos nas macroalgas.....	13
1.5.1. Luz	14
1.5.2. Temperatura.....	17
1.5.3. Disponibilidade de nutrientes	18
1.5.4. Salinidade	21
1.6. Cultivo de macroalgas	23
1.6.1. Aquacultura integrada multi-trófica (IMTA)	24
1.6.2. Impacto da variação das condições de cultivo no perfil nutricional.....	25
1.6.3. <i>Ulva rigida</i>	28
1.7. Objetivos do trabalho	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Algas em estudo.....	35
2.1.1. Primeiro desenho experimental: cultivo em diferentes DC e TR.....	35
2.1.2. Segundo desenho experimental: cultivo em diferentes DC e TA.....	37
2.1.3. Processamento de amostras	37
2.2. Análises físico-químicas realizadas à <i>Ulva rigida</i> proveniente de ambos os desenhos experimentais	38
2.2.1. Teor de humidade relativa e de sólidos	39
2.2.2. Teor de cinzas	39
2.2.3. Teor de proteína.....	40
2.2.4. Cor superficial	40
2.2.5. Índice de acastanhamento	41
2.3. Análise de hidratos de carbono	41
2.3.1. Resíduo insolúvel em álcool (AIR)	42

2.3.2.	Extração de ulvanas	42
2.3.2.1.	Desengorduramento e análise do perfil de ácidos gordos	43
2.3.2.2.	Extração de polissacarídeos, purificação e precipitação em etanol	44
2.3.3.	Análise de açúcares neutros	44
2.3.4.	Análise de ácidos urónicos	46
2.3.5.	Análise das ligações glicosídicas	47
2.3.6.	Dessulfatação	49
2.4.	Tratamento estatístico	50
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1.	Caracterização nutricional do primeiro desenho experimental	53
3.1.1.	Monitorização das condições ambientais	53
3.1.2.	Teor de Humidade relativa e resíduo sólido	55
3.1.3.	Teor de cinzas	56
3.1.4.	Teor de azoto e proteína	57
3.1.5.	Cor superficial	60
3.2.	Caracterização nutricional do segundo desenho experimental	66
3.2.1.	Teor de humidade relativa e resíduo sólido	66
3.2.2.	Teor de cinzas	67
3.2.3.	Teor de azoto e proteína	69
3.2.4.	Cor superficial	72
3.2.5.	Lípidos totais e perfil de ácidos gordos	77
3.3.	Análise de hidratos de carbono	81
3.3.1.	Análise de açúcares neutros e ácidos urónicos	81
3.3.2.	Análise de ligações glicosídicas	87
4.	CONCLUSÃO	91
5.	BIBLIOGRAFIA	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Logótipo da ALGAplus, Lda.	3
Figura 2. Esquematização da incorporação e assimilação de azoto nas algas (49).....	19
Figura 3. Esquema elucidativo do sistema de aquacultura integrada multi-trófica implementado na ALGAplus, Lda.....	25
Figura 4. Representação ilustrativa da macroalga verde <i>Ulva rigida</i>	28
Figura 5. Estrutura das duas principais unidades repetitivas das ulvanas, os ácidos ulvanobiurónicos do tipo A e do Tipo B.	30
Figura 6. Estrutura dos dissacarídeos U_{3s} $U_{2's3s}$ das ulvanas.	30
Figura 7. Esquematização do primeiro desenho experimental estabelecido pela ALGAplus, Lda., para a <i>Ulva rigida</i> cultivada em sistema de IMTA, com variação das condições DC e TR.	36
Figura 8. Esquematização do segundo desenho experimental estabelecido pela ALGAplus, Lda., para a <i>Ulva rigida</i> cultivada em sistema de IMTA, com variação das condições DC e Tipo de água.	38
Figura 9. Representação do espaço de cor CIE-L*a*b* determinado pela coordenadas L*, a* e b* (81).....	41
Figura 10. Variação média mensal da a) temperatura, b) salinidade e c) pH dos tanques de cultivo da <i>Ulva rigida</i> referentes às condições de cultivo LL, LH, HL e HH, no período de novembro de 2016 a julho de 2017. (‰ – permilagem).....	54
Figura 11. Teor de humidade relativa (a) e resíduo sólido (b), em percentagem, da <i>Ulva rigida</i> seca nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.	55
Figura 12. Teor de cinzas, em percentagem de base seca, da <i>Ulva rigida</i> nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.	56

Figura 13. Teor de azoto (a) e proteína (b), em percentagem de base seca, da <i>Ulva rigida</i> nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.	58
Figura 14. Valores médios e respetivo desvio-padrão dos parâmetros de cor a) L*, b) a* e c) b* para a <i>Ulva rigida</i> , nos meses de setembro e janeiro, para as diferentes condições de cultivo LL, LH, HL e HH.	61
Figura 15. a) Teor de humidade relativa e b) resíduo sólido, em percentagem, da <i>Ulva rigida</i> fresca, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN, e HO em T0, T15 e T21.	66
Figura 16. Teor de cinzas, em percentagem de base seca, da <i>Ulva rigida</i> , para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.	68
Figura 17. a) Teor de azoto e b) proteína, em percentagem de base seca, da <i>Ulva rigida</i> para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.	69
Figura 18. Valores médios e respetivo desvio-padrão dos parâmetros de cor a) L*, b) a* e c) b* da <i>Ulva rigida</i> , para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.	73
Figura 19. Representação do cromatograma referente ao perfil de ácidos gordos da condição HN, em T0, da <i>Ulva rigida</i> . Os números assinalados na figura referem-se aos ácidos gordos da Tabela 7.	79
Figura 20. Representação cromatográfica da análise de açúcares neutros por GC-FID da <i>Ulva rigida</i> obtida pelo AIR da condição HO em T0, T15 e T21.	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das macroalgas em termos de clorofilas, ficobiliproteínas e carotenoides referentes aos diferentes filos de macroalgas.	5
Tabela 2. Composição nutricional, em percentagem de base seca (% bs), aproximada das macroalgas comestíveis adaptada de Leonel Pereira (5).	7
Tabela 3. Valores de ΔE^* correspondentes às comparações efetuadas entre as diferentes condições de cultivo para a <i>Ulva rigida</i> , nos meses de setembro e janeiro.	63
Tabela 4. Valores médios de índice de acastanhamento e respetivo desvio-padrão, para a <i>Ulva rigida</i> , nos meses de setembro e janeiro, para as diferentes condições de cultivo.	65
Tabela 5. Valores de ΔE^* correspondentes às comparações efetuadas entre as diferentes condições de cultivo para a <i>Ulva rigida</i> em T0, T15 e T21.	75
Tabela 6. Valores médios de índice de acastanhamento e respetivo desvio-padrão, da <i>Ulva rigida</i> , para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.	77
Tabela 7. Concentração de ácidos gordos e derivados, em mg/Kg alga seca, das frações lipídicas correspondentes às amostras HN (T0), HN (T15) e HO (T15) para a <i>Ulva rigida</i>	80
Tabela 8. Rendimento de AIR, em percentagem de base seca, da <i>Ulva rigida</i> , para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN, e HO em T0, T15 e T21.	81
Tabela 9. Teor de açúcares neutros, açúcares neutros totais, ácidos urónicos e polissacarídeos, em percentagem massa/massa, da <i>Ulva rigida</i> para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO, em T0, T15 e T21.	84
Tabela 10. Ligações glicosídicas, em percentagem molar, das amostras submetidas a extração de ulvanas antes e depois da dessulfatação (T0 – HN, HN_DS; T15 – HN; HN_DS e HO; HO_DS).	88

Lista de Abreviaturas

AA-acetatos de alditol

AAE-Aminoácidos essenciais

AIR-Resíduo insolúvel em álcool

DC-Densidade de cultivo

DMSO-Dimetilsulfóxido

Gal-Galactose

GC-FID-Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama

GC-qMS-Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com analisador quadropolo

Glc-Glucose

GlcA-Ácido glucurónico

HH-Condição elevada DC/elevada TR

HL-Condição elevada DC/baixa TR

HN-Condição elevada DC/ água nova

HO-Condição elevada DC/água velha

HN_DS-Condição elevada DC/ água nova dessulfatada

HO_DS-Condição elevada DC/água velha dessulfatada

IA-Índice de acastanhamento

IdA-Ácido idurónico

IDF-Fibra dietética insolúvel

IMTA-Aquacultura integrada multi-trófica

LH-Condição baixa DC/elevada TR

LL-Condição baixa DC/baixa TR

LN-Condição baixa DC/água nova

LO-Condição baixa DC/água velha

MAAs-aminoácidos do tipo micosporina

PAR-Radiação fotossinteticamente ativa

PMAA-Acetatos de alditol parcialmente metilados

Psu-Unidade de salinidade prática

PUFA-Ácidos gordos polinsaturados

Rha-Ramnose

SDF-Fibra dietética solúvel

TA-Tipo de água

TR-Taxa de renovação de água

UA-Ácidos urónicos

Xyl-Xilose

% bs-percentagem em base seca

% m/m-percentagem massa/massa

% mol-percentagem molar

1. Introdução

1.1. ALGApplus, Lda – Estágio curricular

A ALGApplus – Produção e Comercialização de Algas e seus Derivados (Figura 1) é uma empresa sediada na incubadora de empresas do município de Ílhavo. A principal atividade desta empresa consiste no cultivo e comercialização de macroalgas marinhas de elevada qualidade para mercados de valor acrescentado. Atualmente a empresa detém três marcas, a *ALGA+*® (algas a granel e serviços para empresas), *Tok de Mar*® (produtos alimentares à base de algas para restauração e retalho) e *SeaOriginals* (produtos de bem-estar para SPAs e retalho).

A ALGApplus é a única empresa de aquacultura de macroalgas em Portugal e a primeira da Europa a implementar um sistema de produção de macroalgas diferenciador com um efeito positivo no ambiente e na qualidade de vida dos consumidores. O local de produção da ALGApplus é partilhado com uma aquacultura de peixe de esteiro tradicional, ocorrendo, em simultâneo, a produção das macroalgas em tanques de cultivo. Esta produção ocorre de forma sustentável e com certificação orgânica, num sistema de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA). Este sistema de cultivo garante uma maior produtividade, elevados parâmetros de qualidade, segurança alimentar, rastreabilidade e fornecimento de biomassa durante todo o ano. Desta forma, consegue-se contornar a sazonalidade de algumas espécies no ambiente natural, preservando a manutenção da biodiversidade que caracteriza a costa Atlântica.



Figura 1. Logótipo da ALGApplus, Lda.

1.2. Contextualização

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, do Inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) cerca de 868 milhões de pessoas, isto é, 12,5% da população mundial encontra-se num estado de subnutrição, principalmente, na África e Sudoeste Asiático (1). Adicionalmente esta organização prevê que até 2050 a população atinja cerca de 9 biliões de pessoas, o que pode agravar a percentagem de população malnutrida, sendo importante encontrar fontes alimentares adicionais que possam contrariar esta situação. Atualmente é genericamente aceite que o consumo de algas contribui não só para uma dieta equilibrada, como também ajuda na diminuição do risco de diabetes (2), na prevenção contra doenças cardiovasculares (3) e na diminuição da ocorrência de cancro de mama (4), entre outras doenças. Dentro deste contexto deve realçar-se que as algas integram a lista de superalimentos devido à sua composição físico-química que potencia os benefícios para a saúde e bem-estar da população.

Atendendo às estatísticas da FAO, em 2011 foram produzidas mais de 20 milhões de toneladas de algas a partir da aquacultura. Apesar de existirem mais de 10000 espécies de algas diferentes, apenas cerca de 200 são consumidas em todo o mundo, sendo que destas últimas, apenas 22 são consideradas comestíveis de acordo com a legislação europeia (1). Nas últimas décadas, o aumento da procura de algas devido principalmente ao seu elevado valor nutritivo, obrigou o setor a adaptar-se a modos de cultivo alternativos à prática tradicional. Desta forma, a aquacultura multi-trófica integrada (IMTA) surge como um método alternativo, ambientalmente aceitável, sustentável e menos dispendioso capaz de combinar o cultivo integrado de peixes e macroalgas (5). O cultivo de algas por IMTA é particularmente importante no processo de biorremediação, uma vez que, as algas consomem os nutrientes inorgânicos (NH_4^+ , NO_3^- , ureia, PO_4^{3-}) libertados pelos peixes e moluscos, diminuindo o risco de eutrofização provocado por uma quantidade excessiva de nutrientes no meio (6). Assim, as algas ao transformarem os desperdícios em recursos produtivos tornam o sistema de IMTA mais eficiente, do ponto de vista ambiental e produtivo, diminuindo o impacto da aquacultura tradicional sobre o ambiente marinho. Vários estudos investigaram o comportamento de algumas espécies de algas integradas num sistema de IMTA como a *Saccharina latissima* (7), a *Palmaria palmata* (8), várias espécies de *Porphyra* (6), *Gracilaria* (9) e *Ulva* (10) tendo evidenciado bons resultados no que diz

respeito à quantidade de biomassa de alga produzida e à capacidade de remoção de nutrientes. Para além disso, recentemente tem surgido, por parte das indústrias alimentares, interesse no cultivo de macroalgas em IMTA, uma vez que, alterando determinadas condições de cultivo é possível aumentar o seu valor nutritivo, principalmente, a nível proteico (11). No entanto é importante realçar que o facto da maioria dos sistemas de IMTA serem abertos faz com que haja uma forte contribuição dos fatores abióticos para a alteração da produtividade e da composição físico-química das algas, acentuada pelas variações sazonais.

1.3. Tipos de macroalgas

As macroalgas são algas marinhas macroscópicas, podendo atingir vários metros de comprimento, e cujo talo pode evidenciar um elevado grau de complexidade e organização tecidual sem, no entanto, formarem raízes, caules ou folhas (12). As macroalgas estão na base da cadeia alimentar marinha enquanto produtoras primárias, sendo capazes de sustentar várias comunidades biotas de níveis tróficos acima. A coloração de uma alga não é mais do que a expressão visível da combinação dos diferentes pigmentos fotossintéticos presentes nas células vegetais (5) (Tabela 1), sendo determinante na distinção dos diferentes filos e classes de macroalgas marinhas (13).

Tabela 1. Classificação das macroalgas em termos de clorofilas, ficobiliproteínas e carotenoides referentes aos diferentes filos de macroalgas.

Filo	Cor	Clorofilas	Ficobiliproteínas	Carotenoides
Chlorophyta	Verde	Clorofila <i>a</i> e <i>b</i>	-	β -caroteno
				Luteína
				Violaxantina
				Neoxantina
Ochrophyta	Castanha	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i>	-	Zeaxantina
				Fucoxantina
				β -caroteno
				Violaxantina
Rhodophyta	Vermelha	Clorofila <i>a</i>	Ficoeritrina Ficocianina	α - e β -caroteno
				Luteína
				Zeoxantina

Apesar de as cores das macroalgas poderem ser extremamente variadas, todas elas têm um pigmento fotossintético em comum, a clorofila. Este pigmento está no interior de pequenos organelos, os cloroplastos, responsáveis pela coloração verde da grande maioria das plantas (vasculares e não-vasculares). Desta forma, as macroalgas são classificadas como organismos fotossintéticos marinhos pertencentes ao Domínio Eukarya e aos Reinos Plantae (algas verdes e vermelhas) e Chromista (algas castanhas), respetivamente. As macroalgas vermelhas pertencem ao filo Rhodophyta e possuem como pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, ficobilinas e alguns carotenoides. As macroalgas verdes incluem-se no filo Chlorophyta e o seu conteúdo em pigmentos é semelhante ao das plantas vasculares, sendo ricas em clorofilas *a* e *b* e carotenoides. Por outro lado, as macroalgas castanhas pertencem ao filo Heterokontophyta (ou Ochrophyta) estando todas agrupadas na classe Phaeophyceae. Os pigmentos mais característicos das algas castanhas são as clorofilas *a* e *c* e os carotenoides, sendo a fucoxantina o carotenoide presente em maior abundância e responsável pela sua coloração acastanhada (5).

1.4. Composição nutricional das macroalgas

Atualmente a preocupação em manter um estilo de vida saudável tem sido cada vez maior e, por essa razão, a sociedade tem procurado alimentos alternativos que possam satisfazer, simultaneamente, as suas necessidades e que contribuam para a saúde e bem-estar. Deste modo as algas surgem como uma alternativa promissora, na medida em que, o seu baixo teor calórico aliado ao elevado valor nutritivo contribuem ativamente para o bom funcionamento do organismo, podendo igualmente ser consideradas como um alimento funcional (14-15). As algas comestíveis são excelentes fontes de hidratos de carbono, de proteínas com elevado valor biológico e minerais, tendo a particularidade de possuírem um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados. Na Tabela 2 está representada a composição aproximada de alguns constituintes de algas castanhas, verdes e vermelhas (5). De acordo com Bocanegra *et al.*, (16) o conteúdo de proteína, cinzas, hidratos de carbono e lípidos das algas, em geral, varia entre, aproximadamente, hidratos de carbono, proteína, lípidos e cinzas das algas, em geral, varia entre, aproximadamente, entre 33-75 %, 10-15 %, 3-47 % e 1,5-4 %, respetivamente. O teor de humidade das algas frescas varia entre 80-90 % enquanto das algas secas (em estufa) varia entre 10-20 %. A composição química das algas depende de vários fatores como a espécie, origem geográfica e área de cultivo, sazonalidade,

variações ambientais e fisiológicas durante o tempo da colheita, temperatura da água e métodos de processamento (16).

Tabela 2. Composição nutricional, em percentagem de base seca (% bs), aproximada das macroalgas comestíveis adaptada de Leonel Pereira (5).

	Espécie	Proteína	Cinzas	Hidratos de carbono	Fibra dietética	Lípidos
Algas Castanhas	<i>Fucus vesiculosus</i>	3-14	14-30	46,8	45-59	1,9
	<i>Laminaria digitata</i>	8-15	38	48	36-37	1,0
	<i>Saccharina japonica</i>	7-8	27-33	51,9	10-41	1-1,9
	<i>Saccharina. latissima</i>	6-26	35	52-61	30	0,5 – 1,1
	<i>Sargassum fusiforme</i>	11,6	19,77	30,6	17-69	1,4
Algas Verdes	<i>Caulerpa lentillifera</i>	10-13	24-37	38-59	33	0,9-1,1
	<i>Caulerpa racemosa</i>	17,8-18,4	7-19	33-41	64,9	9,8
	<i>Codium fragile</i>	8-11	21-39	39-67	5,1	0,5-1,5
	<i>Ulva compressa</i>	21-32	17-19	48,2	29-45	0,3-4,2
	<i>Ulva lactuca</i>	10-25	12,9	36-43	29-55	0,6-1,6
Algas Vermelhas	<i>Chondrus crispus</i>	11-21	21	55-68	10-34	1,0-3,0
	<i>Gracilaria chilensis</i>	13,7	18,9	66,1	-	1,3
	<i>Palmaria palmata</i>	8-35	12-37	46-56	29-46	0,7 - 3
	<i>Porphyra tenera</i>	28-47	8-21	44,3	12-35	0,7-1,3
	<i>Porphyra umbilicalis</i>	29-39	12	43	29-35	0,3

1.4.1. Proteínas e aminoácidos

As proteínas são os principais componentes estruturais de todas as células e são constituídas por cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Existem cerca de vinte aminoácidos, dos quais nove são considerados essenciais, pois o organismo não possui capacidade para os sintetizar. Desta forma, não só a quantidade de proteínas ingeridas é importante, mas também a sua qualidade, dado que o valor biológico de uma proteína é uma característica fundamental no bom funcionamento do organismo. O teor de

proteína das algas depende de vários fatores como o filo, a espécie, as condições ambientais e sazonais e o ciclo de vida (17).

De acordo com a Tabela 2, as algas vermelhas e verdes são particularmente ricas em proteínas representando cerca de 8-47 % bs, comparativamente às algas castanhas em que o teor de proteína é mais baixo (3-26 % bs) (16). A *Porphyra* e a *Palmaria* pertencentes às algas vermelhas são consideradas os géneros com maior conteúdo proteico e, por essa razão, são bastante procuradas no mercado devido ao seu elevado potencial nutritivo. O conteúdo de proteína nas algas é bastante afetado pela disponibilidade de nutrientes no meio e varia em função das suas condições de cultivo. Holdt *et al.* (18) verificaram que a quantidade de proteína presente no género *Gracilaria* variou entre 5-23 %. No entanto, Abreu *et al.* (9) observaram que a mesma alga proveniente de um sistema de IMTA possui cerca de 38 % de proteína, podendo atingir os 50 %. A explicação destes resultados assenta no facto de as condições utilizadas no sistema de IMTA proporcionarem ao meio de cultivo das algas um maior teor de nutrientes o que, consequentemente, eleva o teor de proteína.

O valor nutricional de uma proteína pode ser determinado pelo índice químico que avalia a composição em aminoácidos essenciais (AAE). A maioria das algas possui um índice químico de 60, no entanto as algas conhecidas como Wakame e Nori chegam a ter um índice de 100 ultrapassando, não só o índice estabelecido para a maioria dos cereais e vegetais, mas também igualando a maioria das fontes animais (18). Muitas algas apresentam elevadas concentrações de valina e isoleucina, contudo o aminoácido predominante nas algas Wakame e Nori é a leucina. De acordo com Bocanegra *et al.* (16), os aminoácidos essenciais presentes em maior abundância na *Palmaria palmata* são a leucina, a valina e a metionina cujas quantidades são comparáveis com as quantidades encontradas na ovalbumina. Adicionalmente, os principais aminoácidos que constituem a *Ulva pertusa* são a leucina e a lisina e na *Gracilaria changgi* são a glicina, a arginina, a alanina e o ácido glutâmico.

De uma maneira geral, a maioria das algas utilizadas para consumo humano são constituídas principalmente por ácido glutâmico e ácido aspártico (castanhas > verdes > vermelhas) sendo estes aminoácidos em grande parte responsáveis por características específicas do sabor (19). A *Ulva sp.* (16) pode conter até cerca 26 % de ácido glutâmico e 32 % de ácido aspártico, no entanto o conteúdo destes aminoácidos nas algas vermelhas como a *Palmaria palmata* não vai para além dos 14 % e 19 %, respetivamente. Adicionalmente, algumas algas possuem ficobiliproteínas das quais se destacam a

ficoeritrina nas algas verdes e a ficocianina nas algas vermelhas. De realçar que a fração livre de aminoácidos presentes nas algas é maioritariamente responsável pelo seu sabor característico. A título de exemplo, a alanina, o ácido glutâmico e a glicina são os aminoácidos responsáveis pelo sabor característico da alga Nori. Desta forma a inclusão de algas na alimentação representa uma potencial estratégia para aumentar o valor nutritivo da dieta dado a sua riqueza em proteínas com elevado valor biológico contendo aminoácidos essenciais.

1.4.2. Hidratos de carbono e fibra dietética

O teor de hidratos de carbono das algas depende da espécie e pode variar de 20 a 76 %, no entanto não são consideradas um alimento altamente energético devido à baixa digestibilidade dos seus polissacarídeos (18). Nas algas existem três tipos diferentes de polissacarídeos, os polissacarídeos estruturais da parede celular, polissacarídeos de mucilagem intercelulares e os polissacarídeos de reserva (amido) (16). Embora o teor de hidratos de carbono nas algas seja consideravelmente elevado, a sua maior parte está disponível sob a forma de polissacarídeos sulfatados, os quais não são absorvidos pelo sistema digestivo humano. Desta forma, a maioria dos hidratos de carbono são considerados fibra, devido à sua resistência à ação das enzimas digestivas no organismo humano, podendo ser passíveis de fermentação por parte das bactérias presentes no cólon. As fibras podem ser classificadas em solúveis (SDF) ou insolúveis (IDF) de acordo com a sua solubilidade em água. De acordo com Honya *et al.* (20), o teor de fibra total nas algas depende do tempo de colheita, da localização geográfica e das variações sazonais. Desta forma, cada filo possui diferentes tipos de fibras sendo as mais representativas os alginatos, as carragenanas e o agar e, em menor quantidade, a celulose (2-20 %) (16).

Nas algas castanhas, a SDF é constituída por alginatos, fucanas e β -glucanas, enquanto a IDF é constituída por celulose e alginatos insolúveis. O teor de alginatos nestas algas pode variar entre 10-40 %, podendo esta concentração alterar-se em função do tempo de colheita e da profundidade a que cresce a alga. As fucanas podem ser subdivididas em três classes, sendo uma delas as fucoïdanas. Estes últimos são heteropolissacarídeos sulfatados e constituem cerca de 4-20 % das algas castanhas, encontrando-se em elevada quantidade na família das Laminariaceae e em espécies de *Fucus* e *Chordaria* (16).

Relativamente às algas verdes, estas contêm heteropolissacarídeos sulfatados que podem ser solúveis como as ulvanas (8-29 %) e insolúveis como a glucosilana, glucuronanas, celulose, entre outros. Quanto às algas vermelhas, a SDF é constituída por xilanas e galactanas sulfatadas, como o caso da Nori que possui agar e o *Chondrus* que possui carragenanas. Já a fração insolúvel da maioria das algas vermelhas é constituída, maioritariamente, por celulose. O agar é uma fibra solúvel extraída maioritariamente dos géneros *Gracilaria* e *Gelidium* e o seu teor varia de acordo com a estação do ano, tal como foi verificado por Mouradi-Givernaud *et al.* (21), em que a % de agar na alga *Gelidium sesquipedale* atingiu em novembro cerca de 45 %.

1.4.3. Lípidos

Atualmente a prevalência de doenças cardiovasculares e deslipidémias estão maioritariamente relacionadas com o estilo de vida e alimentação da população, uma vez que, a procura por alimentos pré-cozinhados ricos em ácidos gordos saturados é cada vez maior. Em contrapartida, uma dieta rica em ácidos gordos insaturados ajuda a prevenir e minimizar o aparecimento destas doenças e, por esta razão, na última década tem-se verificado um aumento da procura de produtos alimentares ricos neste tipo de ácidos gordos, tanto pelos consumidores, como também pelas indústrias alimentares. A relação entre os ácidos gordos ω -6 e ω -3 ingerida na dieta é importante para a manutenção de um estilo de vida saudável e de acordo com a Organização Mundial de Saúde esta razão não deve ultrapassar 10:1. No entanto, a maioria da população tem uma ingestão diária bastante acima do recomendado (15 a 17:1) (22). Assim, as algas marinhas constituem um potencial alimento alternativo com baixo teor calórico, mas igualmente rico em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) capazes de promover a saúde e bem-estar. De acordo com a Tabela 2, o teor de lípidos das algas castanhas, verdes e vermelhas varia, de uma forma geral, entre 0,3-4,2 % bs, verificando que as macroalgas, de facto, não são uma fonte rica em lípidos (23). Adicionalmente, o conteúdo e composição dos ácidos gordos de cada espécie varia em função das condições ambientais e sazonais durante o tempo de cultivo e colheita (16), verificando-se um maior teor de PUFA essenciais durante o inverno (18). As algas são particularmente ricas em PUFA ω -3 que podem constituir até 50 % do conteúdo total de ácidos gordos da alga (16).

As algas vermelhas são ricas em PUFA como o ácido eicosapentanoico (20:5 ω -3) e o ácido araquidônico (20:4 ω -6). As algas castanhas são particularmente ricas em ácido palmítico (16:0) e em ácido oleico (18:1 ω -9), enquanto as algas verdes como a *Ulva pertusa* contêm elevados teores de ácido hexadecatetraenoico (16:4 ω -3) e de ácido oleico e palmítico (1). Sánchez-Machado *et al.* (24), verificaram que a espécie *Laminaria sp.* (10,8 %) e a *Ulva pinnatifida* (22,6 %) possuem um elevado conteúdo de ácido octadecatetraenoico (18:4 ω -3).

Além dos ácidos gordos, a fração insaponificável das algas marinhas contém fitoesteróis, terpenoides, tocoferóis e carotenoides como o β -caroteno, a luteína e a violaxantina, presentes nas algas verdes e vermelhas e, a fucoxantina presente nas algas castanhas (18). Os fitoesteróis podem ser encontrados em maior quantidade nas algas castanhas do que nas algas verdes e vermelhas, sendo os fucoesteróis característicos das algas castanhas. Algumas bioatividades têm sido apontadas a extratos lipídicos de algumas algas, como a atividade antioxidante e o efeito sinérgico desta atividade com tocoferóis, nomeadamente, de vitamina E (16). Um estudo realizado por Lopes *et al.* (25), revelou que o consumo de algas verdes e castanhas elevou a ingestão de fitoesteróis que, por sua vez, diminuiu a absorção de colesterol. Desta forma, a elevada razão entre ácidos gordos ω -6 e ω -3 presentes nas algas torna o seu consumo importante, contribuindo para o aumento da ingestão de ácidos gordos ω -3, o que por sua vez promove uma dieta mais equilibrada.

1.4.4. Minerais e vitaminas

As algas possuem elevados níveis de minerais que podem representar entre 8-40 % bs (5,16). A quantidade de minerais nas algas pode variar entre espécies e até mesmo entre famílias devido essencialmente a variações ambientais e fisiológicas, origem geográfica, sazonalidade e exposição às ondas (16). De acordo com Rupérez *et al.*, (26) verifica-se que, o conteúdo de cinzas das algas castanhas (30-39 % bs) é, geralmente, mais elevado do que o das algas vermelhas (8-21 % bs) e das algas verdes (12-39 % bs).

As algas marinhas possuem níveis elevados de sais minerais essenciais como o sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), fósforo (P), iodo (I), ferro (Fe) e zinco (Zn). O sódio e o potássio apresentam-se em elevadas quantidades nas algas comparativamente aos níveis descritos em vegetais, embora a relação sódio/potássio (Na/K) seja geralmente baixa (27). A razão Na/K é sem dúvida uma das grandes vantagens das algas como alimento pois, é

ideal para contrabalançar as dietas ocidentais modernas ricas em sódio com baixos teores de potássio que estão relacionadas com a hipertensão e complicações cardiovasculares associadas. Adicionalmente, as algas possuem quantidades elevadas de sulfato (1-6 %bs) ocorrendo geralmente na forma de ésteres de sulfato em polissacarídeos, podendo ligar-se às fucanas nas algas castanhas, às galactanas nas algas vermelhas e às ulvanas nas algas verdes (16). Os níveis de magnésio (28) (500-1000 mg/100g bs) e manganês (33-41 mg/100g bs) (19) das algas são, em geral, mais elevados do que nas plantas terrestres, assim como os níveis de ferro que variam em função da espécie e do tempo de colheita (29). As algas são igualmente ricas em iodo e a sua concentração depende da espécie, das condições de crescimento e desenvolvimento e do seu *habitat* (16). As algas castanhas como a *Saccharina japonica* apresentam um elevado teor de iodo (130-690 mg/100g bs) comparativamente às algas verdes que possuem teores muito mais reduzidos como a *Caulerpa racemosa* que não ultrapassa 0,8 mg/100 g bs (5). Apesar da sua riqueza em minerais, a qualidade da alga deve ser sempre avaliada ao nível dos metais pesados (por exemplo, arsénio, cádmio, cobre, mercúrio, chumbo e zinco), já que estes constituem um potencial risco para a saúde humana (14).

As vitaminas têm um papel fundamental no bom funcionamento do organismo e atuam maioritariamente como antioxidantes. Devido ao estilo de vida e à dieta utilizada, uma percentagem da população é propensa a algumas deficiências em vitaminas e, portanto, o consumo de alimentos funcionais poderá ajudar no combate a este problema. A par dos minerais, algas são uma fonte rica tanto em vitaminas hidrossolúveis como em lipossolúveis.

As algas vermelhas, especialmente a *Porphyra*, possuem a maior quantidade e variedade de vitaminas das quais se pode destacar, a vitamina do complexo B (tiamina, riboflavina), a vitamina A e pró-vitamina A (β -caroteno) e a vitamina E. Os níveis de vitamina C nas algas verdes e castanhas podem variar entre 50-300 mg/100g bs, os quais são comparáveis com as concentrações existentes na salsa e pimentas, enquanto que nas algas vermelhas o teor de vitamina C é muito menor, variando entre 10-80 mg/100g bs. Na alga verde *Enteromorpha sp.* e na alga vermelha *Porphyra sp.* registam-se igualmente níveis consideráveis de vitamina B₁₂ correspondentes a 64 e 32 mg/100g bs, respetivamente (16). Relativamente à vitamina E, as algas castanhas são mais ricas nesta vitamina do que as algas verdes e vermelhas, sendo a família das *Fucoceae* a mais representativa contendo entre 200-600 mg tocoferóis/kg bs (16). Adicionalmente, as algas castanhas possuem várias formas de

tocoferóis como a α -, β - e γ -, enquanto as algas verdes e vermelhas apenas possuem α -tocoferol.

1.5. Influência dos fatores abióticos nas macroalgas

A capacidade de crescimento de um ser vivo e o seu tempo de vida podem ser determinados pelos fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos resultam da interação entre os seres vivos numa determinada região, influenciando o ecossistema do qual fazem parte. Por outro lado, os fatores abióticos dizem respeito a todas as influências que os seres vivos possam receber de um ecossistema, derivadas de aspetos físicos e químicos do meio ambiente. Estes últimos podem ser classificados em fatores abióticos climáticos que caracterizam o clima de uma região, como por exemplo a luz e a temperatura, em fatores abióticos edáficos que caracterizam o solo, destacando como exemplo a composição química, e em fatores abióticos hidrológicos que caracterizam a água, como a salinidade.

Os fatores abióticos afetam não só o desenvolvimento fisiológico dos seres vivos, mas também o seu ciclo reprodutivo, podendo limitar a sua ocorrência em determinados locais de acordo com as suas necessidades fisiológicas (30). Naturalmente, os efeitos que estes fatores têm sobre os padrões de distribuição dos organismos dependem da sua magnitude, duração e frequência. Desta forma, considerando todos os fatores bióticos e abióticos que controlam uma dada população, sugere-se que pelo menos um deverá ser limitante. O conceito de fator limitante vai de encontro à Lei dos Mínimos de *Liebig* (30) que afirma que o desenvolvimento de um organismo poderá ficar limitado devido a uma mudança ao nível do fator limitante, que pode originar uma alteração na densidade da população biótica ou introduzir um desequilíbrio, mesmo que todos os outros fatores estejam presentes adequadamente.

Estudos têm sido realizados desde há décadas de modo a compreender o impacto dos fatores abióticos no crescimento e na atividade das macroalgas. Atualmente, a produtividade das algas é um dos principais alvos de estudo, uma vez que, se pretende compreender como é a que a combinação dos diferentes fatores influencia, por exemplo, a quantidade de biomassa de alga produzida. Adicionalmente, a sazonalidade influencia ativamente os diferentes fatores abióticos em questão, o que pode explicar as grandes diferenças que se observam na quantidade de biomassa de alga ao longo do ano. Estudos realizados por Black *et al.* (31) e Adams *et al.* (32) em diferentes espécies de algas do género *Laminaria*

permitiram verificar que o verão foi a estação do ano em que se atingiu a maior quantidade de biomassa de alga. Em contrapartida, nas estações do outono e inverno a quantidade de biomassa foi menor comparativamente às restantes estações do ano, no entanto as algas nesta altura do ano têm a particularidade de conterem uma quantidade de azoto e de fósforo elevada, podendo ter um efeito benéfico em processos de biorremediação.

Adicionalmente a variabilidade sazonal interfere com a composição química das algas originando uma diferente proporção de certos compostos ao longo do ano, o que pode potenciar a rentabilidade da alga no mercado. Estudos realizados por Pavia *et al.* (33) e Lewey *et al.* (34) permitiram verificar que a variabilidade sazonal interfere com o ciclo reprodutivo, sendo este facto evidenciado pelas alterações fisiológicas ao nível do talo vegetativo de *Ascophylum nodosum* e pela elevação do teor de determinados compostos conforme o estado de maturação da alga *S. muticum*, respetivamente. Adicionalmente, Lewey *et al.* (34) demonstraram que a variação sazonal interferia com o ciclo de crescimento da *S. muticum* resultando na acumulação de compostos fenólicos, de manitol e de laminarinas na alga adulta, contrariamente ao baixo teor de proteína observado na alga jovem. As variações sazonais também têm impacto no teor e na composição química dos ficocoloides, uma vez que interferem com os níveis de alginato e com a razão ácido manurónico/ácido glucurónico na *Myagropsis* e no *Sargassum* resultando numa alteração das propriedades químicas dos extratos. Desta forma sugere-se que a sazonalidade é um fator que provoca diretamente alterações ao nível dos diferentes fatores abióticos como a luz, a temperatura ou a disponibilidade de nutrientes induzindo diferentes proporções de macro e micronutrientes e de determinados compostos quando as algas são expostas a um curto *stress*.

1.5.1. Luz

A luz é um dos principais fatores abióticos que afeta as plantas e devido à sua complexidade atua de diferentes formas. A intensidade luminosa à superfície varia ao longo do dia e com as estações do ano, em função da inclinação dos raios solares e da nebulosidade (1). Deste modo, quanto menor for a inclinação dos raios solares, maior é a proximidade do sol ao horizonte e menor é a quantidade de luz incidente à superfície. A quantidade de luz que chega aos diferentes níveis do ecossistema marinho depende também do efeito que a superfície da água exerce na penetração de luz, dado que uma percentagem da luz incidente

na superfície do mar é refletida (35). Assim, a quantidade de luz refletida depende não só da inclinação dos raios solares, mas também do estado e/ou agitação da água do mar, sugerindo que a diminuição da inclinação dos raios e o aumento da agitação da água traduz-se numa maior percentagem de luz refletida. Adicionalmente, a luz fornece a energia necessária para a realização da fotossíntese, sendo este processo vital para o início e continuidade da cadeia alimentar. Este processo apenas é viável devido à presença de pigmentos nos cloroplastos que têm a capacidade de absorver a energia na gama de comprimentos de onda dos 400-700 nm da região visível do espectro, sendo comumente denominada radiação fotossinteticamente ativa (PAR). A clorofila *a* é o pigmento fotossintético mais abundante das algas, no entanto nos centros de reação estão igualmente presentes pigmentos acessórios, como os carotenoides e as ficobiliproteínas que absorvem comprimentos de onda em regiões do espectro diferentes da clorofila *a*, contribuindo para um melhor aproveitamento da luz incidente e, por conseguinte, potenciando a eficácia do processo fotossintético.

Atualmente muitas investigações têm sido realizadas no sentido de compreender a adaptação das algas a condições de *stress* de luminosidade, a influência que a luz pode ter no metabolismo energético e a alteração da composição físico-química que pode provocar. A luz é importante na regulação de vários processos metabólicos, nomeadamente, na regulação da atividade da fotoliase e na ativação de enzimas antioxidantes (36) como a superóxido dismutase e na *downregulation* de enzimas fotossintéticas como a RuBisCo (37). Desta forma, quando ocorre naturalmente a emersão (descida) da maré, as algas ficam expostas a condições abrutadas de luz, o que desencadeia uma resposta de adaptação característica de organismos intertidais como, a fotoinibição dinâmica, de modo a dissipar o excesso de energia e ativar mecanismos antioxidantes, e a produção de florotaninos i.e., compostos fenólicos poliméricos de floroglucinol, que atuam sobretudo como defesas químicas (38). A capacidade de absorção de comprimentos de onda na zona UV aliada à sua localização na célula, fazem dos florotaninos compostos capazes de filtrar radiações UV. Estudos têm comprovado que a variação sazonal e a exposição a radiação UV têm um impacto significativo no teor e composição de florotaninos (33,39). A síntese e libertação de compostos fenólicos para a água circundante como os florotaninos pelas algas castanhas (40) e as cumarinas pelas algas verdes como a *Dasycladus vermicularis* (41) contribui para a fotoproteção aquando da exposição intensa a radiação UV. Um estudo realizado por Pavia *et al.* (33), pretendeu estudar o efeito da radiação UV-B na concentração de florotaninos na

alga castanha *Ascophyllum nodosum*. Os resultados evidenciaram que um aumento de cerca de 50% de radiação UV-B durante um período de duas semanas resultou num aumento de 30% da concentração de florotaninos relativamente ao grupo de controlo. Estes autores verificaram igualmente um aumento do teor de azoto nas algas expostas a radiação UV-B. Assim, os autores afirmam que o aumento da produção de florotaninos pode resultar indiretamente do efeito da radiação UV-B sobre os nutrientes das algas, influenciando a produção de compostos com elevado teor de azoto.

Analogamente, Cruces *et al.* (42), investigaram a resposta a curto prazo (3h) de três algas castanhas à ação combinada de radiação UV e diferentes regimes de temperatura durante a maré baixa no verão. Os resultados evidenciaram que a exposição a elevadas temperaturas associada à radiação UV diminuiu os processos fotoquímicos, dado que sob estas condições, a alga ficou sujeita a um processo de fotoinibição dinâmica adquirindo a capacidade de neutralizar fotoquimicamente o excesso de energia solar. Estes autores verificaram igualmente que a atividade antioxidante e a concentração de florotaninos foi elevada nas algas expostas a elevada temperatura e radiação UV. Desta forma, os resultados sugerem que a *downregulation* fotoquímica e a produção rápida de florotaninos, estimulada pela radiação UV, minimizou os efeitos de *stress* oxidativo e manteve os processos fotoquímicos durante o *stress* térmico a curto prazo. Adicionalmente, estudos realizados por Pavia *et al.* (33) e Cruces *et al.* (42) sugerem que a produção de florotaninos na periferia das células vegetais foi estimulada pela exposição à radiação UV, atuando como escudos de proteção das células contra à fotodestruição. Para além da produção de florotaninos tem-se verificado igualmente a adoção de um processo fotoinibitório por parte das algas comprovado pela diminuição da taxa fotossintética e um aumento do nível de aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) com função fotoprotetora aquando de uma exposição elevada a radiação UV conjugada com baixa disponibilidade de nutrientes (43).

De facto, a exposição por um período curto ou longo a luminosidade intensa pode afetar a composição bioquímica das algas. Um dos objetivos de um estudo realizado por Boderskov *et al.* (44) consistia em avaliar o efeito da luz no crescimento e na composição química da alga *Saccharina latissima* durante o outono e o início do inverno. Os resultados evidenciaram que para os dois níveis de luminosidade não se registou uma diferença significativa no crescimento da alga. No entanto, o nível de luminosidade mais baixo registou um aumento da concentração de pigmentos, nomeadamente de clorofila *a* e de

fucoxantina, ao longo do tempo. Os resultados verificam que o aumento do conteúdo de pigmentos devido à menor disponibilidade de luz ao longo do período experimental era esperado tendo em conta o processo de aclimação geral característico destes organismos. Analogamente, sugere-se que a variação sazonal do fotoperíodo afeta o teor de pigmentos das algas, verificando-se que no outono e inverno a diminuição do fotoperíodo leva a uma menor exposição das algas à luz e, por conseguinte, uma menor taxa fotossintética, resultando numa acumulação de pigmentos.

Assim, a luz é um dos fatores abióticos mais importantes dado que permite às macroalgas realizar o processo de fotossíntese. Aquando da exposição das macroalgas a elevados níveis de radiação, a alga induz a síntese de florotaninos como medida fotoprotetora. Adicionalmente, a variação do fotoperíodo ao longo do ano resulta numa maior ou menor taxa fotossintética, fazendo variar a concentração de pigmentos e, por sua vez, de proteína.

1.5.2. Temperatura

A temperatura é um dos fatores abióticos mais influentes na distribuição e abundância dos organismos. Atendendo ao momento (dia ou estação do ano) em que ocorre a exposição ao ar, os organismos intertidais podem sofrer com a temperatura de modo indireto. Quando a maré é alta, as temperaturas da água do mar mantêm-se mais ou menos constantes e contêm níveis de oxigénio, dióxido de carbono e nutrientes dissolvidos que os organismos podem utilizar na sua alimentação. Por outro lado, quando a baixa-mar ocorre durante o dia, o aumento de temperatura é superior, comparativamente à sua ocorrência em períodos noturnos, devido à insolação, o que pode apressar e intensificar os fenómenos de dessecação. Vários estudos têm demonstrado que as alterações climáticas têm um efeito direto sobre o desempenho fisiológico e a sobrevivência dos organismos, bem como indireto mediando as interações entre espécies como, por exemplo, a competição, a predação e o herbivorismo (45).

A influência da temperatura nas taxas das reações químicas é notória afetando, por sua vez, as vias metabólicas (30). Para além da importância da temperatura na distribuição das espécies, a sazonalidade é um fator que interfere de forma direta nas oscilações de temperatura. Desta forma, um estudo realizado por Werner *et al.* (46) teve como objetivo perceber se existia alguma alteração ao nível dos mecanismos de regulação e manutenção da

Fucus vesiculosus e das suas epífitas em resposta às alterações climáticas em diferentes estações do ano. Os resultados evidenciaram que o aumento da temperatura da água do mar na estação do verão levou a um aumento excessivo das epífitas nos talos da *F. vesiculosus*, e no outono/inverno levou a uma diminuição da biomassa de alga. Analogamente, Gao *et al.* (47) investigaram as alterações sazonais na biomassa, crescimento e maturação da *Saccharina japonica* durante três anos. Verificou-se uma diminuição da biomassa de *S. japonica* na transição do primeiro para o segundo ano, observando-se inexistente no terceiro ano. Adicionalmente, no segundo ano verificou-se a ocorrência tardia de esporófitos e falhas na reprodução de esporófitos, sugerindo que o ciclo de vida desta alga é influenciado por pequenas flutuações na temperatura. Paralelamente, a influência da temperatura na taxa de crescimento foi avaliada por Kim *et al.* (48) em quatro espécies pertencentes ao género *Porphyra*, de forma a avaliar qual das espécies apresentava uma resposta fisiológica mais adequada à prática de aquacultura. De facto, o aumento da temperatura levou ao aumento da taxa de crescimento específica na *P. amplissima* e à diminuição nas restantes algas. Este facto pode ser explicado com base na gama de tolerância que cada uma das espécies de *Porphyra* se consegue adaptar, ou seja, a *P. amplissima* teve um limite de tolerância à temperatura maior do que as restantes algas e uma distribuição geográfica diferente, o que lhe permite ter uma capacidade de adaptação maior, aumentando o seu crescimento e, por conseguinte, elevando a produção de biomassa.

Desta forma, os estudos realizados por Werner *et al.* (46), Gao *et al.* (47) e Kim *et al.* (48) sugerem que a variação sazonal da temperatura pode ter diferentes efeitos conforme a espécie de alga. Contudo, de uma maneira geral, este fator abiótico afeta, principalmente, a quantidade de biomassa produzida, a reprodução e o crescimento das algas.

1.5.3. Disponibilidade de nutrientes

O meio de cultivo deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das algas marinhas, podendo estes ser divididos em três categorias, os macronutrientes (N, P, C, etc.), os micronutrientes ou elementos essenciais (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo) e as vitaminas (Vitamina B12, tiamina e biotina) (35). O azoto e o fósforo são os principais nutrientes que limitam o crescimento e a produção de algas na maioria dos ambientes naturais. Porém, a baixa concentração de nutrientes no meio nada nos diz à cerca da limitação da alga em termos nutritivos, podendo esta concentração ser definida pelo balanço entre a taxa de fornecimento

e o *uptake* de nutrientes pelas algas (35). Adicionalmente, a concentração de nutrientes no meio varia com a localização geográfica, sendo exemplo disso as regiões de clima temperado em que durante o outono e inverno a concentração de nutrientes é máxima e na primavera e verão é mínima. As algas podem utilizar uma grande variedade de compostos azotados para fazer face às suas necessidades nutritivas, como amónio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), ureia, aminoácidos e nucleósidos, sendo o NH_4^+ e o NO_3^- as fontes mais consumidas pela maioria das espécies (30). Na Figura 2 está representado, esquematicamente, os mecanismos de incorporação e assimilação de azoto por parte das células das algas.

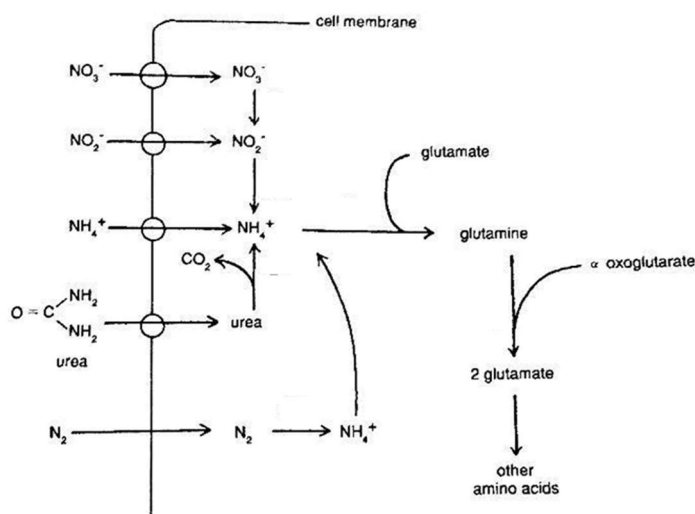


Figura 2. Esquematização da incorporação e assimilação de azoto nas algas (49).

De uma maneira geral, a alga possui enzimas específicas capazes de reduzir as diferentes formas de azoto presentes no meio (NO_3^- , NO_2^- , ureia) a amónio, antes de serem incorporadas na forma de aminoácidos e outros compostos orgânicos. No caso do azoto molecular (N_2) este apenas é utilizado aquando da baixa concentração das fontes primárias de nutrientes, através de um processo de fixação de azoto realizado pelas cianobactérias. Adicionalmente, a taxa a que ocorre a assimilação das diferentes formas de azoto depende, sobretudo, da espécie da alga (50). A título de exemplo, as algas *Gelidium nudifrons* e a *Laminaria groenlandica* consomem simultaneamente NO_3^- e NH_4^+ à mesma taxa. Contudo, na maioria das espécies de algas o NH_4^+ , tem a capacidade de inibir a taxa de *uptake* de NO_3^- em cerca de 50 %.

Relativamente ao fósforo, as formas mais utilizadas pelas algas são as inorgânicas como o fosfato (PO_4^{3-}), o hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) e o di-hidrogenofosfato (H_2PO_4^-). A maior parte das algas necessitam de uma maior quantidade de azoto e menor de fósforo

comparativamente ao fitoplâncton, o que sugere que as algas são muito mais sensíveis à limitação de azoto do que o fitoplâncton (35). A razão dos dois nutrientes (N e P) necessária para um crescimento máximo das algas é denominada razão máxima que para as algas é de, aproximadamente, 30:1 podendo variar de 10:1 a 80:1 (30). Se a razão N:P na água for superior a 30:1 o crescimento da alga será limitado pelo P e a quantidade excessiva de N permanece no meio ou pode ser armazenada no tecido de alga. Se N:P for inferior a 30:1 o crescimento da alga fica limitado pelo N, permanecendo uma quantidade elevada de P no meio.

A disponibilidade de nutrientes pode sofrer flutuações espaciais e sazonais, tendo um impacto fisiológico e bioquímico nas diferentes espécies de algas (51). Muitos estudos têm avaliado a variabilidade natural da quantidade de biomassa produzida, assim como têm identificado fatores ambientais limitantes, centrando-se, por exemplo, na influência da disponibilidade de nutrientes nas relações carbono/azoto, no teor de pigmentos e nas taxas de crescimento das algas (52). Desta forma, um estudo realizado por Bolderskov *et al.* (44) consistiu no estudo do efeito da disponibilidade de nutrientes no crescimento e na concentração tecidual de azoto, de carbono e de pigmentos da *Saccharina latissima* durante o outono e o início do inverno. Para isso, utilizaram dois sistemas de tanques com duas concentrações de nutrientes diferentes. Os resultados evidenciaram um aumento da concentração tecidual de azoto e uma diminuição da concentração de carbono nas algas cultivadas com uma concentração de nutrientes mais elevada. Este facto é explicado pela variação de nutrientes que ocorre sazonalmente, ou seja, durante o outono e o inverno existe uma maior disponibilidade de nutrientes no meio e, por esta razão, a estratégia das algas passa pelo armazenamento de azoto na forma de proteínas, pigmentos, aminoácidos ou nutrientes inorgânicos em detrimento de hidratos de carbono. Desta forma, sugere-se que a maior disponibilidade de nutrientes contribui para o aumento do conteúdo proteico. Contudo, a diminuição da incorporação de carbono, devido ao maior armazenamento de azoto, associado às baixas temperaturas que ocorrem durante o outono e o inverno parecem atenuar a taxa de crescimento das algas, o que resulta numa diminuição da produtividade.

Analogamente, um estudo realizado por Msuya *et al.* (10) pretendeu avaliar o efeito de diferentes combinações entre o *load* de nutrientes e da agitação da água na produtividade, *uptake* de azoto e composição química da *Ulva lactuca*. Estes autores verificaram que ao nível da produtividade/biomassa não se registaram diferenças significativas entre os

diferentes *load* de nutrientes, contrariamente ao conteúdo proteico em que o aumento do *load* de contribui para o aumento do teor de proteína na *Ulva lactuca*. Adicionalmente, os resultados evidenciaram um efeito positivo da agitação apenas para um *load* de nutrientes abaixo dos 4 g N m⁻² dia⁻¹, sugerindo que a agitação da água nos tanques tinha como vantagem acelerar a difusão de nutrientes, principalmente em condições limitantes ao nível nutritivo.

Tendo em conta a influência que a disponibilidade de nutrientes pode ter na composição bioquímica da alga, um estudo realizado por Figueiroa *et al.* (53) pretendeu avaliar o efeito do fornecimento de nutrientes na acumulação interna de compostos (pigmentos fotossintéticos e conteúdo em azoto e carbono) e na produção de biomassa em tanques cultivados com *Ulva lactuca*. Estes autores verificaram que a suplementação de nutrientes influencia positivamente o conteúdo de proteína e de pigmentos e, de forma negativa o *uptake* de carbono, resultado explicado pelo modelo de balanço carbono/nutriente. Após a exposição a elevada radiação por um curto período, estes autores verificaram uma diminuição da fluorescência das clorofilas, assim como do conteúdo de clorofilas podendo explicar mais uma vez o fenómeno de fotoinibição de modo a proteger o aparelho fotossintético de radiações intensas. Adicionalmente, têm sido reportados outros efeitos associados à disponibilidade de nutrientes como o impacto na qualidade e na valorização de algumas espécies de agarófitas como a *Gracilaria spp.* (54) e a modificação da composição bioquímica das algas originada pela exposição a concentrações mais elevadas de nutrientes, como o aumento da concentração de florotaninos e de MAAs (55).

Desta forma, as diferentes concentrações de nutrientes que ocorrem sazonalmente têm a capacidade de influenciar a composição físico-química das macroalgas, principalmente em termos proteicos. A disponibilidade de nutrientes em conjunto com os restantes fatores abióticos (luz e temperatura) contribuem para as diferenças registadas ao nível da produtividade ao longo do ano.

1.5.4. Salinidade

A salinidade é um dos fatores químicos que limita a distribuição dos organismos e consiste na massa total de sais dissolvidos num quilograma de água. Na zona intertidal a salinidade apresenta grandes variações comparativamente com o mar aberto, principalmente quando a maré baixa. Desta forma, as algas que se encontram na zona intertidal são expostas

frequentemente a um elevado *stress* em resultado de uma exposição periódica a uma vasta gama de condições ambientais severas como flutuações na salinidade, dessecação, radiação intensa e elevadas temperaturas (56). A dessecação ocorre durante a maré baixa e acarreta consequências mais graves do que o stress salino dado que a exposição intensa e temporária a elevadas temperaturas e radiação conduzem a uma forte desidratação a nível celular, contrariamente ao que acontece em condições de *stress* salino em que as células das algas permanecem temporariamente em contacto com a água de baixo potencial (56). Perto da costa, a salinidade da água pode variar devido a precipitações e/ou influxos de água doce que resultam em baixa salinidade (*stress* hipossalino) ou evaporação da água que resulta no aumento de salinidade (*stress* hipersalino).

Martins *et al.* (57) estudaram o efeito da variação da salinidade na taxa de crescimento da macroalga verde *Enteromorpha intestinalis*. Considerando a gama de salinidade avaliada por estes autores de 0 a 30 psu (*practical salinity unit*) verificou-se que para valores extremos de salinidade (<10 psu e >28 psu) a taxa de crescimento da alga diminuiu, observando-se uma diminuição mais acentuada para valores mais baixos de salinidade. Analogamente, Martins *et al.* (57) verificaram um aumento da taxa de crescimento na gama de salinidade dos 10 a 22 psu, com uma taxa ótima de crescimento entre os 17 e 22 psu. Os resultados sugerem que a elevada precipitação durante o inverno resulta numa diminuição da salinidade da água, contrariamente ao que acontece durante o verão em que a radiação intensa a par de elevadas temperaturas, aumenta a concentração de sais na água. De realçar que a precipitação elevada durante o inverno contribui também para a diminuição da luminosidade na coluna de água e para o aumento da turbulência dos sedimentos, resultando na diminuição da taxa de crescimento e da produtividade.

Similarmente, num estudo realizado por Choi *et al.* (58) onde se avaliou a taxa de crescimento da *Ulva pertusa*, verificou-se que no extremo mínimo e máximo da gama de salinidade estabelecida esta alga registou uma diminuição acentuada do crescimento. Adicionalmente, outras espécies pertencentes ao género *Ulva* com diferentes capacidades de tolerância a regimes baixos e elevados de salinidade têm sido estudados como o caso da *Ulva lactuca* que demonstrou em cultura ser mais tolerante à hipersalinidade do que à hipossalinidade (59), como já tinha sido verificado anteriormente por Martins *et al.* (57). Para além do efeito na taxa de crescimento, o impacto da variação da salinidade nas algas está igualmente presente nas alterações ao nível da composição iónica e de compostos

osmorreguladores que possam de alguma forma explicar o modo de adaptação das algas às condições de *stress* salino (51). Back *et al.* (60) demonstrou que a adaptação osmótica de diferentes populações de *Fucus* a uma vasta gama de salinidades envolveu a acumulação de manitol.

1.6. Cultivo de macroalgas

Uma das utilizações mais conhecidas e tradicionais das algas é na alimentação humana, no entanto a sua aplicação como fertilizantes e como alimento para os animais tem sido notória. Desde cedo se compreendeu que o potencial das algas marinhas era elevado e, por esta razão, várias investigações foram realizadas no sentido de valorizar comercialmente este produto. O elevado número de aplicações recentemente descobertas das macroalgas, devido aos potenciais compostos bioativos que possuem, levou ao aumento da procura deste produto nas últimas décadas, ultrapassando a capacidade máxima da produção por parte dos ecossistemas naturais. Assim, a necessidade de desenvolver indústrias que apostem no cultivo de macroalgas de modo a dar resposta ao aumento da procura intensificou-se, porém a aposta na investigação para conhecer melhor os ciclos de vida destas algas, assim como os seus genomas é essencial para melhorar a qualidade e a quantidade das suas aplicações e da biomassa produzida. Analogamente, nas últimas décadas o aumento drástico do consumo mundial de peixe e frutos do mar resultou numa incapacidade de resposta por parte da captura de peixe tradicional (61). Desta forma, a aquacultura surgiu de modo a equilibrar a lacuna existente entre a procura dos consumidores e a produção pela via tradicional, estimando-se que em 2030 mais de 50 % da produção mundial de frutos do mar e peixe provenha da aquacultura (62). Contudo, a industrialização da aquacultura intensiva e semi-intensiva originou graves problemas ecológicos, como a libertação excessiva de nutrientes e a eutrofização da costa, dado que apenas 30 % da alimentação fornecida é consumida e assimilada pelas espécies cultivadas e mais de 70 % é libertada no meio ambiente de forma direta ou através dos efluentes (63).

Paralelamente, o cultivo de algas pode ser realizado no mar ou em terra. No cultivo em mar o controlo de condições ambientais e interações bióticas é praticamente inexistente o que afeta a escolha do local de cultivo assim como da espécie. Adicionalmente as algas no mar estão alocadas num substrato dado que a água está em constante movimento, o que

provocaria a sua dispersão. Resumidamente, vários métodos são utilizados para o cultivo de algas no mar como o método da balsa flutuante, que consiste numa estrutura que permanece na superfície por meio de boias, subindo e descendo de acordo com as mudanças da maré, o método de *long-line* em que algas são igualmente colocadas numa corda que está suspensa por boias, e o método de suporte imóvel em que estacas de madeira são cravadas na areia e entre elas é esticada uma corda onde são colocadas as algas a uma distância bem definida. Contrariamente, o cultivo em terra é realizado em tanques que podem estar localizados no interior das salinas, ficando em contacto direto com o meio ou podem estar individualizados. Nestes últimos o controlo das condições ambientais e interações bióticas é muito superior comparativamente aos tanques nas salinas e o cultivo em mar, potenciando a manipulação de condições de modo a originar um produto de valor acrescentado. Assim, encontrar uma solução adequada para combater os problemas ecológicos associados à prática de aquacultura é fundamental para a expansão sustentável deste setor. Desta forma, a aquacultura integrada multi-trófica (IMTA) de macroalgas e peixes surge como uma solução ambientalmente aceitável, alternativa e menos dispendiosa necessária para garantir a sustentabilidade da indústria da aquacultura a longo prazo.

1.6.1. Aquacultura integrada multi-trófica (IMTA)

O sistema de IMTA combina o cultivo integrado de animais e macroalgas obtendo-se uma complementaridade das necessidades (Figura 3). Esta prática é particularmente útil em sistemas de produção de espécies de níveis tróficos mais elevados, em produção intensiva e semi-intensiva (sistemas em que existe a adição de alimento exógeno no sistema e de forma artificial, como suplemento ou de uso integral), uma vez que estas algas podem remover até cerca de 90% das descargas de nutrientes. Estudos realizados por Neori *et al.* (64) sobre o uso de macroalgas como organismos biorremediadores no tratamento de efluentes da aquacultura, têm evidenciado a potencialidade das macroalgas na remoção de compostos azotados e fósforo, quando integradas neste tipo de sistema de cultivo.

Desta forma, as macroalgas, cultivadas na ALGApplus, Lda., integradas neste tipo de sistema de aquacultura (Figura 3) utilizam a energia solar e os nutrientes provenientes dos tanques de aquacultura de peixe, principalmente, N, P, e C, para se reproduzirem e crescerem, através da fotossíntese. Este sistema encontra-se aberto, ou seja, a água proveniente dos tanques de cultivo das macroalgas é canalizada para um tanque de descarga

e não regressa ao tanque de aquacultura de peixe, tal como se verifica em alguns sistemas de IMTA. Adicionalmente, a escolha da macroalga é também um fator chave no bom funcionamento do sistema de IMTA e deve ser selecionada tendo em conta a sua finalidade. Se o valor da biomassa é o critério escolhido, então a seleção da macroalga deverá ser baseada na qualidade do tecido e no valor acrescentado dos compostos secundários, como os ficocoloides. Porém, se a biorremediação de nutrientes é prioritária, a escolha da macroalga deve ser baseada na sua capacidade de captação e assimilação dos nutrientes inorgânicos, a forma de armazenamento e a taxa de crescimento. Na ALGApplus, Lda., a maioria das macroalgas cultivadas através deste sistema são a *Ulva rigida*, a *Gracilaria sp.* e a *Porphyra dioica*, sendo a alga verde alvo de estudo ao longo deste trabalho.

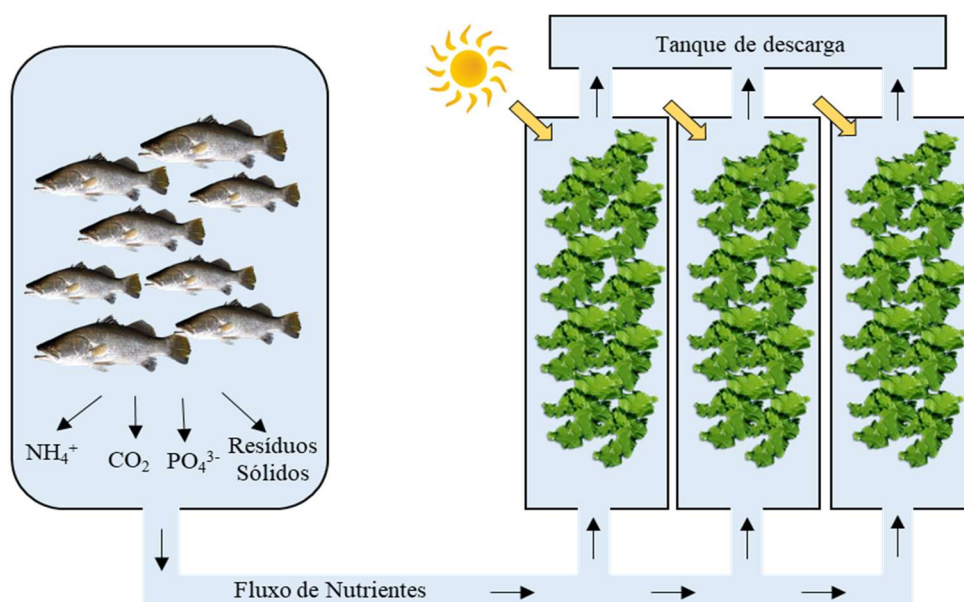


Figura 3. Esquema elucidativo do sistema de aquacultura integrada multi-trófica implementado na ALGApplus, Lda.

1.6.2. Impacto da variação das condições de cultivo no perfil nutricional

Além do efeito positivo que a aquacultura integrada multi-trófica de peixes e macroalgas tem nos processos de biorremediação de efluentes e na mitigação da eutrofização devido à libertação excessiva de nutrientes (65), este sistema é atualmente bastante procurado pelo potencial valor da biomassa que pode originar. Vários estudos têm documentado que a variação de determinadas condições num sistema de IMTA pode interferir na composição nutricional das macroalgas, resultando numa valorização da

biomassa produzida (9,11). Dado que a maioria dos sistemas de IMTA são ao ar livre, o controlo dos fatores ambientais torna-se difícil. Desta forma, as macroalgas utilizadas neste tipo de sistema devem ter um limite de tolerância considerável, de modo a adaptar-se ao máximo de condições ambientais possíveis, mantendo a rentabilidade.

As algas produzidas por IMTA apresentam geralmente maior produtividade e menor variabilidade ao nível do teor de proteína comparativamente às algas de ambiente natural, uma vez que existe neste tipo de aquacultura um contínuo fluxo de nutrientes e o mínimo de perturbação causada, por exemplo, por epífitas (9,63). Alguns autores têm demonstrado que diferentes espécies de algas como a *Gracilaria cornea* (66), a *Porphyra dioica* (67) e a *Ulva lactuca* (68) podem ser utilizadas como substitutos parciais na alimentação diária de peixes, devido principalmente ao seu teor de proteína e/ou qualidade do perfil de aminoácidos. Assim sendo, um dos interesses da prática de IMTA centra-se na otimização de certas condições de cultivo de modo a elevar o valor nutricional das macroalgas, principalmente, a nível proteico e mineral. Um estudo realizado por Korzen *et al.* (11) pretendeu determinar a taxa de crescimento e o conteúdo de hidratos de carbono e de proteína da *Ulva rigida* e da *Gracilaria bursa-pastoris* quando expostas a diferentes distâncias de uma cultura de peixe em “gaiola”. Os resultados evidenciaram o aumento da taxa de crescimento e do conteúdo proteico com a diminuição da distância às gaiolas dos peixes. Esta observação deve-se à maior presença de nutrientes inorgânicos excretados pelos peixes junto ao seu local de cultivo, o que eleva não só a taxa de crescimento das algas, mas também ao aumento do teor de proteína. Por outro lado, verificou-se uma diminuição do conteúdo em polissacarídeos com a diminuição da distância ao local de cultivo dos peixes, dado que a curtas distâncias e sob uma elevada concentração de nutrientes, as algas incorporam azoto em detrimento de carbono. Desta forma, quando a distância ao local de cultivo dos peixes aumenta, a disponibilidade de nutrientes baixa e a alga tende a sintetizar compostos orgânicos, diminuindo a incorporação de azoto.

De acordo com Abreu *et al.* (69), a cultura tradicional de algas apresenta alguns problemas relacionados com o modo de cultivo e as variações sazonais na disponibilidade de nutrientes, tornando deste modo o IMTA um potencial candidato para solucionar este problema. Estes autores observaram que a taxa de crescimento da *Gracilaria chilensis* foi elevada perto da zona de cultivo de salmão evidenciando uma elevada capacidade de *uptake* de azoto contribuindo ativamente para a diminuição do teor de nutrientes presentes na água.

Analogamente, Abreu *et al.* (9), verificaram que a alga *Gracilaria vermiculophylla* demonstrou uma elevada taxa de crescimento, assim como uma elevada *performance* de remoção de nutrientes ao longo de toda a experiência (1 ano), embora durante os meses de inverno tenha ocorrido uma ligeira diminuição da taxa de crescimento. Estes autores testaram várias combinações de densidade de cultivo (DC) e de taxa de renovação de água (TR) verificando que o melhor conjunto foram, respetivamente, 3 kg.m⁻² e 200 L.h⁻¹. Este facto sugeriu que a variação sazonal ao longo do ano implicou um ajustamento das condições de cultivo de modo a maximizar os níveis de produtividade. Adicionalmente, o elevado *uptake* de nutrientes pela alga sugere a presença de um elevado teor proteico podendo deste modo ser valorizada economicamente, assim como ser utilizada em sistemas de IMTA como um eficiente biofiltro. De facto, a sazonalidade é um fator determinante quando se quer rentabilizar a quantidade de biomassa de alga produzida tal como verificaram Edding *et al.* (70) em que a produtividade da alga *Chondrus canaliculatus* no outono foi de apenas 40 g.m⁻³.semana⁻¹ enquanto na primavera foi de 200 g.m⁻³.semana⁻¹. Estes autores testaram ainda diferentes densidades de cultivo verificando que 8,4 kg.m⁻³ originou a maior produção de carragenana (26 %), assim como se registou uma maior quantidade de biomassa de alga. Relativamente ao impacto que a sazonalidade pode ter principalmente ao nível nutricional, Marinho *et al.* (71) estudaram as variações sazonais ao nível das cinzas, de proteína e do perfil de aminoácidos da *Saccharina latissima* cultivada num sistema de IMTA. Estes autores verificaram uma variação da concentração de proteína atingindo o máximo em novembro (10,8 % bs) e o mínimo em maio (1,3% bs), sendo o ácido aspártico e o ácido glutâmico os aminoácidos presentes em maior quantidade. A variação sazonal também teve impacto no perfil de aminoácidos, observando-se uma maior concentração de lisina no verão. A menor concentração de cinzas foi observada em julho, enquanto o mês de janeiro registou as maiores concentrações.

Desta forma, pelo sistema de IMTA podem ser testadas, durante o cultivo de macroalgas, diferentes condições de modo a compreender o seu efeito não só ao nível nutricional, como também ao nível da produtividade, tendo sempre em conta o fator sazonalidade.

1.6.3. *Ulva rigida*

A *Ulva rigida*, mais conhecida como alface-do-mar, é uma alga marinha pertencente ao filo Chlorophyta, com uma flutuação de cor entre o verde-claro e o verde-escuro e com a forma de uma lâmina orbicular, mais ou menos lobada (12), tal como evidenciado na Figura 4. O género *Ulva* compreende diferentes espécies cosmopolitas capazes de se adaptar a uma elevada gama de condições ambientais como a salinidade, a luminosidade e a temperatura, podendo deste modo denominarem-se eurialinas, eurifóticas ou euritéricas, respetivamente. Adicionalmente, existe uma elevada dificuldade em classificar taxonomicamente as diferentes espécies de *Ulva*, dada a simplicidade morfológica das suas lâminas folióticas distromáticas e a falta de características que muitas vezes exibem variação intra-específica e sobreposição inter-específica, o que contribui frequentemente para a difícil interpretação de resultados publicados (72). Na ALGAplus Lda., a identificação da *Ulva rigida* foi realizada ao nível do genoma nuclear, das sequências ITS (espaçador transcrito interno) ribossomais e do gene *rbcL* do cloroplasto. Desta forma, comprovou-se que, efetivamente, a espécie utilizada nos desenhos experimentais foi, efetivamente, a *Ulva rigida*.



Figura 4. Representação ilustrativa da macroalga verde *Ulva rigida*.

Adicionalmente, esta macroalga apresenta uma estrutura extremamente fina, sendo a lâmina constituída apenas por duas camadas de células quando observada em corte transversal. O estado reprodutivo dos talos é observado quando estes apresentam uma região marginal amarelo acastanhada. Desta forma, quando observamos as macroalgas verdes ao microscópio, as lâminas celulares da região referida anteriormente surgem cheias de células-filhas, que são libertadas através de um pequeno poro central existente na parede da célula mãe, passando a partir deste momento a denominarem-se gâmetas ou zooides.

O ciclo de vida das diferentes espécies de *Ulva* consiste na sequência de duas gerações diferentes, a geração gametófita, haploide (n), em que ocorre o processo de fecundação através de ambos os gametas ou zooides (um masculino e outro feminino) dando origem a um ovo ou zigoto ($2n$). Este zigoto, após sucessivas mitoses origina a segunda geração, denominada esporófito, diploide ($2n$), produtora de esporos (zoósporos) (73). Assim, o ciclo de vida da *Ulva* pode ser classificado como digenético, pois possui duas gerações distintas, isomórfico, pois os talos de diferentes gerações apresentam uma morfologia idêntica, e haplodiplonte, uma vez que a geração gametófita é haplonte e a geração esporófito é haplodiplonte. Outra forma de reprodução amplamente utilizada é a propagação vegetativa onde ocorre a fragmentação do talo, sendo este método bastante utilizado pela ALGAplus, Lda no cultivo de *Ulva rigida*. Este último modo de reprodução associado à sua elevada tolerância a diferentes condições ambientais e ampla distribuição geográfica fazem da *Ulva rigida* uma candidata promissora para a sua utilização num sistema de IMTA com vista à manipulação de condições de cultivo que possam ter um impacto no seu perfil nutricional.

Para além da sua fisiologia e tendo em conta o que já foi descrito quanto à composição nutricional para as algas verdes, sabe-se que as espécies pertencentes ao género *Ulva sp.* são, particularmente, ricas em proteína comparativamente às restantes algas verdes (5). Para além disso, possuem como principal polissacarídeo de reserva o amido e como principais polissacarídeos da parede celular, as ulvanas e, em menor quantidade, celulose, xiloglucanas e glucuronanas (74). As ulvanas são os principais polissacarídeos encontrados nas algas verdes, nomeadamente, nos géneros *Ulva* e *Enteromorpha* e constituem entre 18-29% da fração de hidratos de carbono destas algas (74).

As ulvanas, como parte da parede celular de algas verdes, possuem funções osmóticas, incluindo um papel no equilíbrio iónico ou na prevenção de dessecação das algas devido à sua natureza altamente higroscópica (74). Relativamente à estrutura, as ulvanas são heteropolissacarídeos sulfatados compostos por resíduos de ramnose, xilose, ácido glucurónico e ácido idurónico. A quantidade de cada resíduo ou a sua organização no próprio polissacarídeo pode variar de acordo com diferentes fatores, como a distribuição geográfica (75), o método de extração (76), a espécie (74) ou a sazonalidade (77), conferindo uma grande variabilidade e complexidade à estrutura das ulvanas. Tal como descrito por Lahaye *et al.* (74), as ulvanas possuem dois tipos de unidades estruturais repetitivas principais, os

ácidos ulvanobiurónicos do tipo A (ácido- β -D-glucurónico (GlcA) ligado a α -L-ramnose-3-sulfato (Rha3S) por ligações (β 1 \rightarrow 4)) e do tipo B (ácido α -L-idurónico (IdA) ligado a α -L-ramnose-3-sulfato por ligações (α 1 \rightarrow 4) (Figura 5).

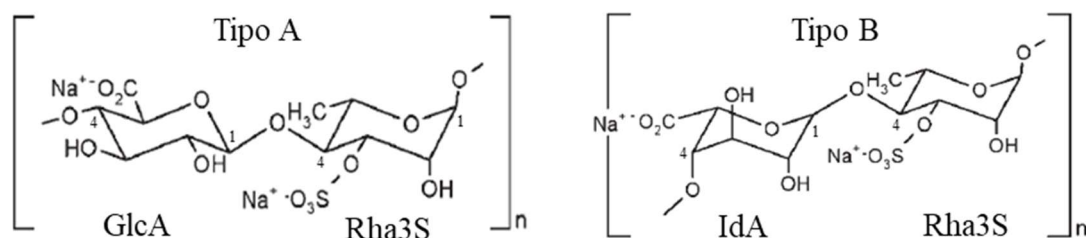


Figura 5. Estrutura das duas principais unidades repetitivas das ulvanas, os ácidos ulvanobiurónicos do tipo A e do Tipo B.

Para além disso, podem ocorrer igualmente a presença de resíduos de xilose ligados à ramnose, substituindo assim o ácido urónico, tal como evidenciado na Figura 6 (U_{3s}). Adicionalmente, dada a variabilidade das ulvanas entre as diferentes espécies de algas verdes, podem ocorrer alterações ao nível da posição dos grupos sulfato, estando descrita a sua presença no carbono 2 ou 3 da ramnose (78,79) e no carbono 2 da xilose, originando o dissacarídeo $U_{2's3s}$ representado na Figura 6.

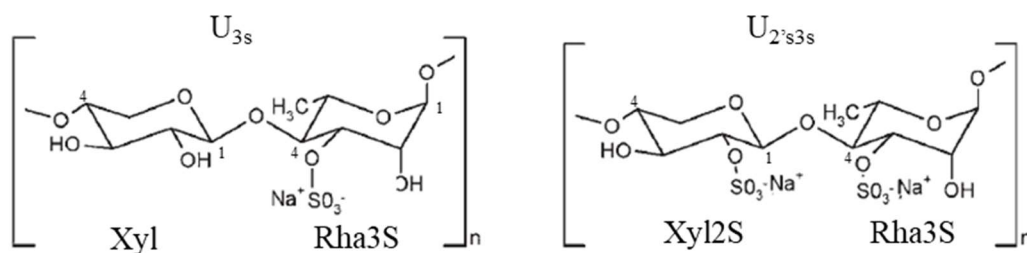


Figura 6. Estrutura dos dissacarídeos U_{3s} $U_{2's3s}$ das ulvanas.

De facto, vários estudos (9,69) realizados em macroalgas cultivadas em sistema de IMTA têm verificado que a variação de diferentes condições de cultivo, como a densidade de cultivo e a disponibilidade de nutrientes no meio, originam uma alteração da composição físico-química ao nível de diferentes macronutrientes. Esta alteração é mais evidente, quando se conjuga o fator sazonalidade que, no caso da ALGAplus, Lda., é bastante importante dado que o sistema de IMTA é aberto. Para além do estudo do valor nutricional das macroalgas quando sujeitas a diferentes fluxos de nutrientes, considera-se igualmente, importante

compreender de que forma é que as macroalgas e, particularmente, a *Ulva rigida* se adapta a condições que envolvam diferentes concentrações de nutrientes no meio de cultivo. Consequentemente, verifica-se a escassez de estudos que avaliem, sobretudo, o perfil nutricional das macroalgas cultivadas em sistema de IMTA quando submetida a diferentes concentrações de nutrientes no meio, especialmente, depleção de nutrientes. Tendo em conta alguns estudos realizados em microalgas, sabe-se que estas quando expostas a regimes de depleção de nutrientes são capazes de alterar o seu metabolismo, produzindo como resposta imediata elevados teores de amido. De facto, a implementação de diferentes desenhos experimentais, que avaliem o impacto de todas estas condições durante o cultivo de macroalgas torna-se importante não só a nível industrial, como também ao nível científico.

1.7. Objetivos do trabalho

As macroalgas são apontadas como os novos “superalimentos” de origem vegetal, principalmente devido à sua riqueza em nutrientes e propriedades bioativas. Embora o seu consumo na Europa comparativamente ao dos países asiáticos seja ainda bastante reduzido, tem surgido um crescente interesse, sobretudo no setor alimentar, na exploração e utilização deste alimento no consumo diário devido à sua riqueza nutricional, antevendo-se um aumento considerável da inclusão de macroalgas nos hábitos alimentares nos países europeus.

Neste contexto, um dos principais objetivos deste trabalho visou compreender de que forma a modulação de diferentes condições de cultivo poderá influenciar os parâmetros nutricionais da *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA. Desta forma foram implementados dois desenhos experimentais, fazendo variar diferentes condições de cultivo em diferentes estações do ano. No primeiro desenho experimental pretendeu-se avaliar alterações de alguns parâmetros nutricionais e físicos da *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA, em dois períodos sazonais diferentes (setembro e janeiro), pela variação da densidade de cultivo e taxa de renovação de água. Neste desenho experimental procedeu-se à monitorização/análise de teor de humidade relativa, resíduo sólido, cinzas, proteína e o parâmetro físico cor superficial das macroalgas nas quatro condições de cultivo, *ie*, baixa DC/baixa TR (LL), baixa DC/elevada TR (LH), elevada DC/baixa TR (HL) e elevada DC/elevada TR (HH).

No segundo desenho pretendeu-se, principalmente, avaliar o perfil de hidratos de carbono da *Ulva rigida* cultivada igualmente em sistema de IMTA, ao longo de um período de três semanas, fazendo variar a densidade de cultivo e o tipo de água. Analogamente, neste desenho experimental foram analisados diversos parâmetros nutricionais e físicos, nomeadamente, o teor de humidade relativa, resíduo sólido, cinzas, proteína, cor superficial, lípidos totais, perfil de ácidos gordos e análise de açúcares neutros e ácidos urónicos, nas quatro condições de cultivo, *ie*, baixa DC/água nova (LN), baixa DC/água velha (LO), elevada DC/água nova (HN) e elevada DC/água velha (HO). Adicionalmente pretendeu-se avaliar a composição das ulvanas através de uma análise das ligações glicosídicas e dos locais de ligação dos ésteres de sulfato pela realização de uma dessulfatação. Como objetivo final pretende-se avaliar, de acordo com o parâmetro nutricional, qual a melhor combinação de condições de cultivo que permitam à empresa obter uma *Ulva rigida* com um maior valor nutritivo. Para ambos os desenhos experimentais foram realizadas diferentes análises físico-químicas de modo a caracterizar os principais constituintes das algas pretendendo, no final, avaliar qual a melhor combinação de condições de cultivo que permita à empresa uma macroalga com maior valor nutritivo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Algas em estudo

A principal atividade da ALGAplus Lda., consiste no cultivo de diferentes espécies de macroalgas marinhas em sistema de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA). Uma das principais macroalgas cultivadas na empresa é a *Ulva rigida* devido à sua elevada tolerância a diferentes condições ambientais, o que torna possível a sua reprodução nas diferentes estações do ano. Consequentemente esta macroalga é bastante procurada no mercado não só pela sua disponibilidade ao longo do ano, mas também pelas suas características que a tornam agradável ao paladar. Tendo em conta os factos anteriores e sabendo que esta alga é responsável pela maioria da rentabilidade da empresa, torna-se importante compreender a existência ou não da possibilidade de oferecer ao consumidor um produto de maior qualidade e valor nutritivo. Desta forma, no âmbito do estágio realizado na ALGAplus Lda., pretendeu-se modular o sistema de IMTA testando-se diferentes condições de cultivo na *Ulva rigida*, nomeadamente, a densidade de cultivo (DC), a taxa de renovação de água (TR) e o tipo de água (TA), de modo a compreender o impacto desta modulação no perfil nutricional desta macroalga. Assim nos pontos 2.1.1 e 2.1.2 apresentam-se dois desenhos experimentais, estabelecidos pela empresa, com diferentes condições de cultivo e, posteriormente, descrevem-se a forma de amostragem e as metodologias utilizadas para avaliar os diferentes parâmetros nutricionais da macroalga em estudo.

2.1.1. Primeiro desenho experimental: cultivo em diferentes DC e TR

A implementação do desenho experimental representado na Figura 7 visou compreender qual a melhor combinação de condições de cultivo de modo a obter a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA com maior valor nutricional. Para isso, neste desenho foram avaliadas duas condições de cultivo diferentes, a DC e a TR. A primeira condição diz respeito à quantidade inicial de alga necessária para repovoar um tanque com um determinado volume, expressa em quilogramas (kg) por m³. A segunda condição diz respeito à taxa com que a água de um tanque é totalmente renovada num determinado espaço de tempo, expressa em segundos (s) por litro (L). Desta forma, para este desenho experimental, foram estabelecidas duas densidades de cultivo, baixa e alta, e duas taxas de renovação de água, baixa e alta, originando no total quatro combinações testadas em triplicado.

Para facilitar a compreensão dos resultados foram criadas abreviaturas para as quatro condições de cultivo, sendo a primeira letra da abreviatura referente à DC e a segunda à TR. Dada a existência de uma baixa e alta DC e TR designou-se, simultaneamente, por L (do Inglês *low*), a baixa DC e TR e, por H (do Inglês *high*), a alta DC e TR. Note-se que a divulgação das especificidades das condições de cultivo não foi autorizada pela empresa. Assim de acordo com a Figura 7, as condições **LL** e **LH** foram testadas com a baixa DC, contrariamente às condições **HL** e **HH** que foram testadas com a alta DC. Relativamente à taxa de renovação de água, as condições **LL** e **HL** foram testadas com a baixa TR e as condições **LH** e **HH** foram determinadas com a alta TR. De realçar que a taxa a que se dá a substituição de água no tanque de cultivo depende do volume do tanque, resultando assim em diferentes TR. Este desenho experimental foi efetuado em duas épocas sazonais diferentes, nomeadamente no verão (setembro) e inverno (janeiro), tendo o período de cultivo uma duração de cerca de duas semanas. Adicionalmente, durante o cultivo das macroalgas foram monitorizadas condições ambientais, através de uma sonda, designadamente, temperatura, salinidade e pH, nos tanques de cultivo da *Ulva rigida*, tendo sido esta monitorização realizada aleatoriamente várias vezes por mês no período de novembro de 2016 a julho de 2017.

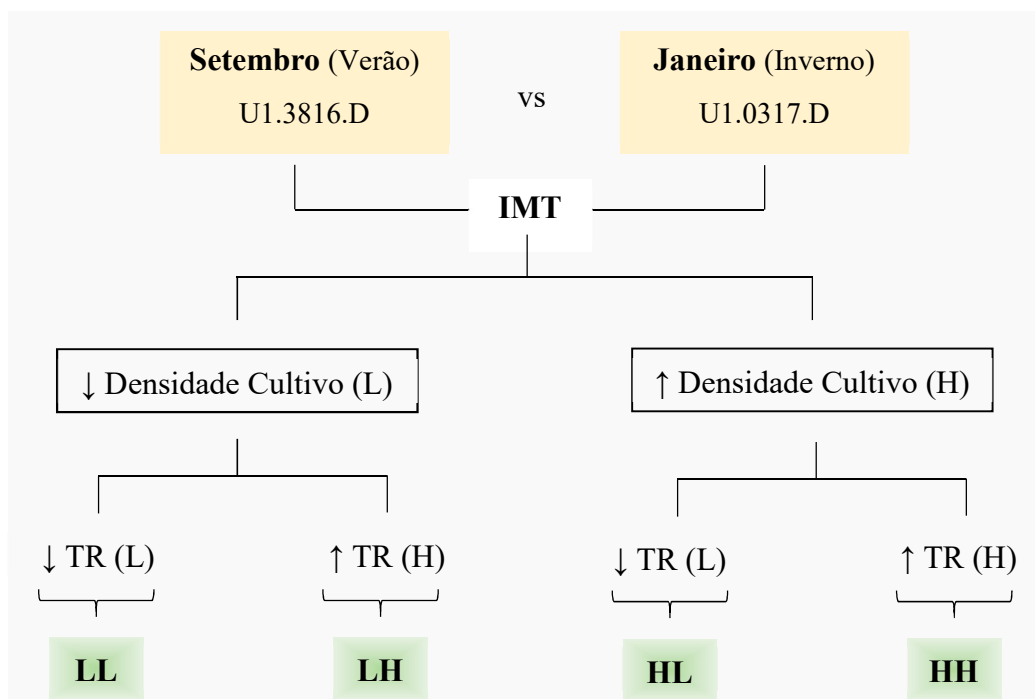


Figura 7. Esquematização do primeiro desenho experimental estabelecido pela ALGAplus, Lda., para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA, com variação das condições DC e TR.

2.1.2. Segundo desenho experimental: cultivo em diferentes DC e TA

O estabelecimento do desenho experimental representado na Figura 8 visou compreender o efeito da modulação de determinadas condições de cultivo, principalmente, no perfil de hidratos de carbono da *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA. Deste modo foram testadas no mês de outubro, duas condições de cultivo diferentes, designadamente a DC e o tipo de água (TA). Para esta última condição estabeleceu-se dois tipos de água, a água N (do Inglês *new*) e a água O (do Inglês *old*). A primeira diz respeito a uma água com um maior teor de nutrientes e a segunda a um menor teor de nutrientes. Desta forma, para este desenho experimental, foram estabelecidas duas densidades de cultivo, baixa e alta, e dois tipos de água, a água N e a água O, originando no total quatro condições de cultivo diferentes. Tal como no primeiro desenho experimental, de modo a facilitar a compreensão dos resultados, foram criadas abreviaturas para as diferentes condições, sendo a primeira letra referente à DC e a segunda ao tipo de água. Assim, as condições LN e LO foram testadas com a DC mais baixa, contrariamente às condições HN e HO testadas com a DC mais elevada. Relativamente ao tipo de água, as condições LN e HN foram testadas com o tipo de água nova e as condições LO e HO foram testadas com o tipo de água velha. Tal como no primeiro desenho experimental, a divulgação das especificidades das condições de cultivo não foi autorizada pela empresa. Este desenho experimental teve uma duração de vinte e um dias, tendo sido recolhidas amostras no início da experiência (T0) e após quinze (T15) e vinte e um dias (T21) relativamente ao tempo inicial. De realçar que de forma a criar as condições desejadas, durante todo o desenho experimental, não ocorreu renovação da água de cultivo nos tanques.

2.1.3. Processamento de amostras

Após a respetiva duração do desenho experimental, as amostras de *Ulva rigida* foram recolhidas dos tanques de cultivo e submetidas a processamento na empresa. Esta etapa consistiu, primeiramente, num processo de lavagem das algas maquinizado (concebido pela BTL-Indústrias Metalúrgicas, Lda) utilizando água da ria previamente tratada por radiação ultravioleta, de forma a remover a maioria das areias e epífitas presentes nas algas. O excesso de água foi em seguida removido por centrifugação (FTNON-Food Technology Noord-oos Nederland B.V.) a 1500 rpm. As macroalgas referentes ao segundo desenho experimental (secção 2.1.2) foram recolhidas nesta etapa e armazenadas no congelador até análise. Por

outro lado, as macroalgas do primeiro desenho experimental (secção 2.1.1) foram secas a 25 °C no secador de circulação convectiva de ar quente (Frigossistema) durante 12-16 h e mantidas em lugar seco até análise.

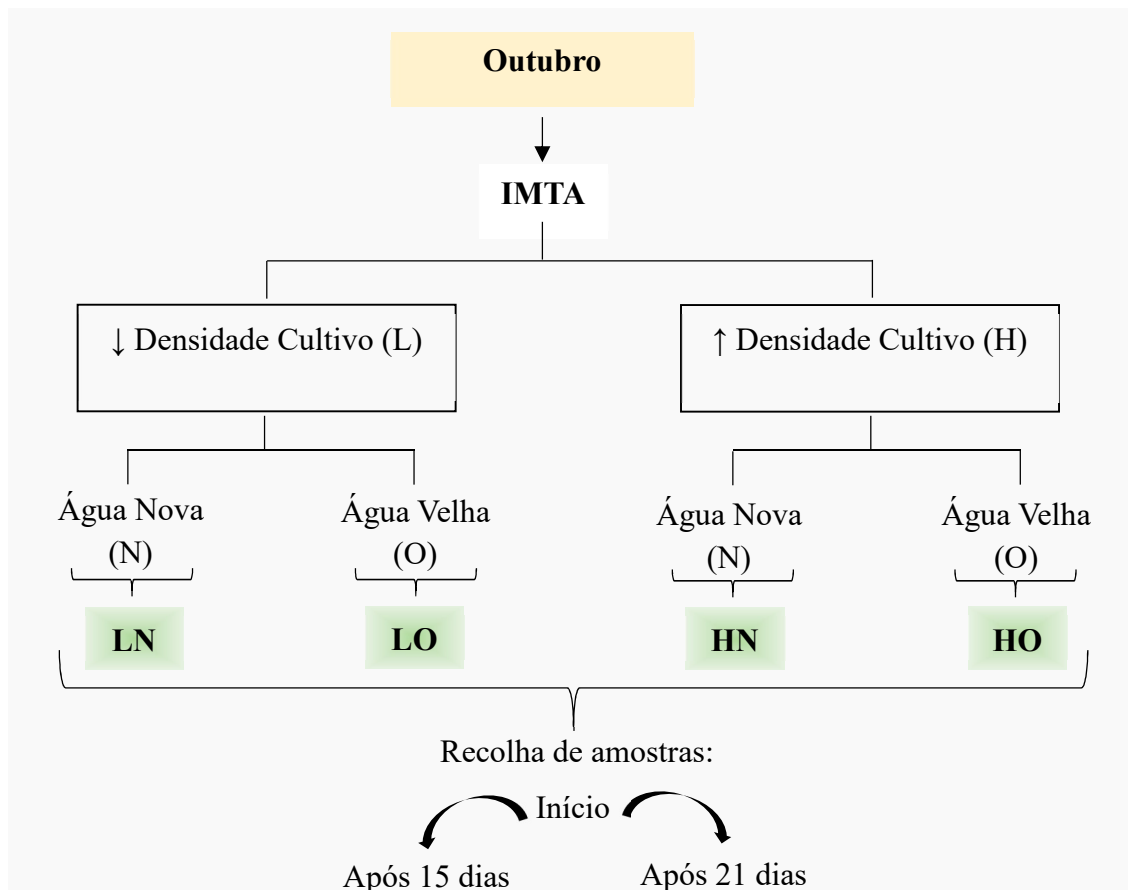


Figura 8. Esquematização do segundo desenho experimental estabelecido pela ALGAplus, Lda., para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA, com variação das condições DC e Tipo de água.

2.2. Análises físico-químicas realizadas à *Ulva rigida* proveniente de ambos os desenhos experimentais

A macroalga *Ulva rigida* proveniente do primeiro e segundo desenhos experimentais foi submetida a diversas análises físico-químicas. Algumas das análises descritas, nos próximos subcapítulos, foram realizadas às amostras provenientes de ambos os desenhos experimentais, nomeadamente, a determinação do conteúdo de humidade relativa, sólidos, cinzas, proteína e cor superficial. Os restantes procedimentos foram apenas realizados à *Ulva rigida* proveniente do segundo desenho experimental. Deve ainda ser realçado que a

determinação da humidade e da cor superficial foram efetuadas com alga inteira, enquanto as restantes análises foram efetuadas com amostras previamente sujeitas a congelação, seguidas de liofilização e moagem em moinho de café (DIN 4188, Retsch) e posterior peneiração com crivo de 0,225 mm.

2.2.1. Teor de humidade relativa e de sólidos

O teor de humidade relativa da *Ulva rigida* foi determinado pela perda de peso após secagem da alga na estufa. Para a execução do método, os cadinhos foram previamente secos na estufa (series ED 115, Binder) a 105 °C durante 2 h. Em seguida, foram arrefecidos num exsiccador e, após 30 min, foram pesados na balança analítica. Adicionou-se cerca de 1 g de alga a cada cadinho (3 réplicas) e colocou-se na estufa *overnight* a uma temperatura de 105 °C. Após este tempo de secagem, arrefeceram-se os cadinhos no exsiccador, durante 30 min, e posteriormente foram pesados. Estes passos de secagem e pesagem foram efetuados até ao registo de peso constante. A percentagem de humidade foi calculada como a razão entre a perda de massa após a secagem e a massa de amostra inicial, tal como indicado na equação 1. A partir do valor da percentagem de humidade foi ainda calculado o teor de matéria seca (sólidos) presente na amostra, de acordo com a equação 2.

$$\% \text{ Humidade relativa} = \frac{m(\text{amostra inicial}) - m(\text{amostra seca})}{\text{massa (amostra inicial)}} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

$$\% \text{ Sólidos} = 100 - \% \text{ Humidade relativa} \quad (\text{equação 2})$$

2.2.2. Teor de cinzas

As cinzas de um alimento são o termo analítico correspondente ao resíduo inorgânico que persiste após a combustão da matéria orgânica. Desta forma, após a determinação do teor de humidade descrito no subcapítulo anterior (2.2.1), procedeu-se à determinação do teor de cinzas de ambas as amostras previamente liofilizadas/secas e moídas. Para isso, tendo já determinado o resíduo seco, os cadinhos foram submetidos a uma primeira incineração numa placa de aquecimento até à ausência de libertação de fumo. De seguida, foram colocados na mufla, durante cerca de 6 h, a 550 °C, obtendo-se no final um resíduo branco correspondente às cinzas. Após este período, arrefeceram-se os cadinhos no exsiccador e

determinou-se o teor de cinzas através da razão entre a massa de cinzas e de amostra seca tal como demonstrado na equação 3.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{massa (cinzas)}}{\text{massa (amostra seca)}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

2.2.3. Teor de proteína

O teor de proteína das amostras foi determinado por análise elementar por combustão recorrendo ao equipamento Truspec 630-200-200 com detetor de condutividade térmica. Para a determinação do teor de proteína foi considerado o fator de *Kjeldahl* de 6,25 multiplicando-se pelo teor de azoto obtido na análise elementar.

2.2.4. Cor superficial

A *Ulva rigida* seca e fresca (provenientes do primeiro e segundo desenhos experimentais, respetivamente), foram colocadas inteiras em água destilada, durante cerca de 15 min e, de seguida, foram dispersas em papel absorvente para remoção do excesso de água. A cor superficial foi medida recorrendo a um colorímetro (CM 2300d, Konica Minolta, Japan) nas folhas da *Ulva rigida* sem qualquer tipo de sobreposição e/ou dobras. Antes da medição de cor, o colorímetro foi calibrado com a cor branca padrão, tendo-se, posteriormente, realizado a medição de cor pelo menos cinco vezes em zonas diferentes das folhas da macroalga. A cor superficial foi expressa em coordenadas L^* , a^* e b^* pertencentes ao espaço de cor CIE- $L^*a^*b^*$. Segundo este espaço de cor (80,81) representado na Figura 9, o parâmetro L^* diz respeito à luminosidade que pode ser medido numa escala compreendida entre 0 e 100, em que o extremo mínimo e máximo correspondem, respetivamente, ao preto e branco. Relativamente aos parâmetros a^* e b^* estes representam as coordenadas cromáticas que podem tomar valor negativos (-) ou valores positivos (+) correspondendo, respetivamente, ao verde(-)/vermelho(+) ou azul(-)/amarelo(+) (Figura 9).

Adicionalmente, através do espaço de cor CIE- $L^*a^*b^*$ foi possível quantificar a diferença de cor, expressa pelo parâmetro ΔE^* e representado na equação 4. Este último parâmetro visa compreender a diferença total de cor entre as três coordenadas através dos valores médios de L^* , a^* e b^* . Geralmente, o ΔE^* é calculado entre uma amostra e um padrão. Porém, para o primeiro desenho experimental, devido à inexistência de um padrão, o ΔE^* foi calculado entre as diferentes condições de cultivo para os meses de setembro e

janeiro. Quanto ao segundo desenho experimental, o ΔE^* foi calculado com base nas diferenças de cor entre o T15 e o T21 relativamente ao T0 (padrão).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (\text{equação 4})$$

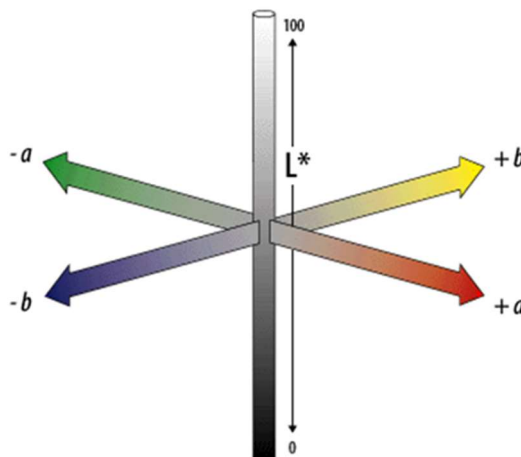


Figura 9. Representação do espaço de cor CIE-L*a*b* determinado pela coordenadas L*, a* e b* (81).

2.2.5. Índice de acastanhamento

O índice de acastanhamento (IA) foi determinado a partir das coordenadas cromáticas L*, a* e b*, pela utilização das expressões representadas nas equações 5 e 6, comumente utilizadas para frutos e vegetais (82,83).

$$IA = \frac{[100 \times (X - 0,31)]}{0,17} \quad (\text{equação 5}) \quad \text{onde,} \quad X = \frac{(a^* + 1,75 \times L^*)}{(5,645 \times L^* + a^* - 3,012 \times b^*)} \quad (\text{equação 6})$$

2.3. Análise de hidratos de carbono

O conteúdo de hidratos de carbono foi analisado apenas para a *Ulva rigida* proveniente do segundo desenho experimental, dado o objetivo mais específico deste estudo. Numa primeira aproximação, efetuou-se a preparação de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) com a *Ulva rigida* previamente liofilizada e moída, o qual foi submetido a uma análise de açúcares neutros e ácidos urónicos. Algumas amostras foram ainda sujeitas a uma análise aprofundada de ulvanas, tendo-se para tal efetuado uma extração de ulvanas a partir da alga seca e uma análise de ligações glicosídicas, com e sem dessulfatação.

2.3.1. Resíduo insolúvel em álcool (AIR)

O resíduo insolúvel em álcool (AIR) baseia-se na baixa solubilidade dos polissacarídeos em solventes orgânicos como o etanol, dando origem a um precipitado rico em material polimérico que pode, posteriormente, ser analisado ao nível da sua composição química.

Inicialmente pesou-se, numa balança analítica, 1 g de *Ulva rigida* seca e previamente moída para um copo. De seguida adicionou-se 100 mL de uma solução de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 80 % v/v) e colocou-se sob agitação, durante 10 min, a uma temperatura compreendida entre 70-80 °C. Após este período deixou-se arrefecer a solução anterior durante alguns minutos e transferiu-se todo o conteúdo da solução para tubos de Falcon de 100 mL. Seguidamente acertou-se o peso dos tubos de modo a ficarem equilibrados e levaram-se a centrifugar, durante 10 min, a 6000 rpm. Após a centrifugação removeu-se o sobrenadante de cada tubo, lavou-se o resíduo remanescente com etanol a 96 % (v/v), acertou-se novamente o peso dos tubos e centrifugou-se nas mesmas condições.

Posteriormente removeu-se de novo o sobrenadante e lavou-se o resíduo por duas adições sucessivas de etanol a 96 % (v/v) intercaladas por centrifugação. Na última lavagem adicionou-se acetona pura, centrifugou-se e removeu-se, com a ajuda de uma micropipeta, o máximo de acetona possível, obtendo-se nesta etapa o resíduo insolúvel em álcool. Por fim secou-se o AIR *overnight* numa estufa à temperatura de 40 °C e, após este tempo, registou-se o peso do resíduo necessário para o cálculo do rendimento.

2.3.2. Extração de ulvanas

O procedimento de extração de ulvanas seguido de purificação minimiza possíveis contaminações que possam alterar a interpretação correta dos resultados relativamente à caracterização deste polissacarídeo. Neste trabalho, a extração de ulvanas foi efetuada segundo o método proposto por Alves *et al.* (84), com algumas adaptações. Este método engloba, numa fase inicial, um processo de remoção de lípidos e pigmentos, com mistura de diclorometano e acetona (secção 2.3.2.1), a extração de polissacarídeos com solução aquosa a 75-85 °C, seguida de eliminação de amido por degradação enzimática. Note-se que, uma vez que a fração lipídica das algas é um parâmetro que pode ser afetado por condições de cultivo, neste trabalho optou-se também por efetuar uma análise do perfil lipídico do extrato lipídico obtido por este procedimento, tal como descrito na secção 2.3.2.1.

2.3.2.1. Desengorduramento e análise do perfil de ácidos gordos

Pesaram-se 10 g de *Ulva rigida* desidratada e previamente moída para um cartucho de papel de filtro selado com agrafos. De seguida procedeu-se à montagem do Soxhlet e adicionou-se ao balão de fundo redondo, com reguladores de ebulição, 250 mL de uma solução de diclorometano e acetona na proporção 1:1. Colocou-se o cartucho no interior do Soxhlet e iniciou-se este processo de extração que se prolongou durante 7 h. A solução extraída foi posteriormente filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 µm e, de seguida, transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL, previamente seco na estufa durante 2 h a 105 °C e pesado. Após a evaporação de solvente, num evaporador rotativo, o conteúdo do balão foi seco na estufa *overnight*, à temperatura de 105 °C. O teor de lípidos totais, em percentagem, foi calculado através da diferença de peso inicial do balão (seco) e o peso final do balão após concentração da solução e secagem.

Para análise do perfil lipídico, ressuspendeu-se a fração lipídica do balão em 12 mL de *n*-hexano, transferiu-se para um porta-amstras de vidro e pulverizou-se com azoto para evitar possíveis oxidações. As amostras foram guardadas no congelador a -20 °C até análise por cromatografia gasosa acoplada a um espetrómetro de massa (GC-MS). Atendendo à baixa volatilidade dos lípidos, as amostras foram previamente derivatizadas para conversão dos grupos hidroxilo e carboxilo dos lípidos em grupos derivados de trimetilsililo (TMS), tal como descrito por Isca *et al.* (85). Para isso, a fração lipídica ressuspensa em *n*-hexano foi seca por fluxo de azoto até atingir cerca de 20 mg de extrato seco. O extrato seco obtido anteriormente foi dissolvido em 250 µL de solução de piridina e tetracosano (1,5 mg/mL m/v) e, posteriormente, adicionou-se 250 µL de BSTFA (bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) e 50 µL de TMSCI (trimetilclorosilano). A sililação ocorreu por reação em banho a 70 °C, durante 30 minutos e, após este período, o conteúdo foi transferido para *vials*.

A análise cromatográfica foi executada por injeção das amostras derivatizadas no cromatógrafo GCMS-QP2010 Shimadzu acoplado a um injetor automático AOC-20i e uma coluna DB-5 (30 m comprimento, 0,25 mm diâmetro e 0,25 µm espessura). O programa de eluição decorreu numa coluna capilar DB-5 (30 m comprimento, 0,32 mm diâmetro e 0,25 µm espessura) com hélio (35 cm/s). O programa de temperatura começou a 70 °C durante 5 minutos, seguido de um aumento de temperatura a 4 °C por minuto até atingir os 250 °C, a partir dos quais aumentou para 300 °C a 2 °C por minuto, permanecendo a essa temperatura durante 5 minutos. A identificação dos compostos foi efetuada com base nos seus derivados

TMS comparando o espectro de massa com dados da biblioteca de espectros (NIST 2014, Wiley 2007; Shimadzu Pesticide Library) pelo *GCMSsolution software* (Shimadzu). A calibração foi efetuada pelos compostos de referência puros, representativos das maiores famílias lipofílicas (colesterol para derivados do colesterol, pentadecenol para álcoois de cadeia longa e ácido palmítico para ácidos gordos em geral). As curvas de calibração foram calculadas relativamente ao tetracosano utilizado como padrão interno.

2.3.2.2. Extração de polissacarídeos, purificação e precipitação em etanol

Após a remoção dos lípidos e pigmentos da amostra, procedeu-se à extração em água quente dos polissacarídeos. Para isso, o resíduo foi recuperado do interior do cartucho e deixado na hotte *overnight*, de forma a evaporar todo o diclorometano e acetona. O resíduo seco foi em seguida colocado num copo, ao qual foram adicionados 300 mL de água destilada, tendo a mistura permanecido sob agitação durante 7 h, à temperatura entre 75-85 °C. Após este período, procedeu-se à filtração da mistura através de tecido de nylon, tendo o resíduo sido descartado, enquanto a solução filtrada foi transferida para tubos de Falcon de 50 mL e sujeita a centrifugação durante 10 min a 6000 rpm. Adicionalmente, após a centrifugação, a solução foi ainda filtrada através de funil de placa sintetizada G3 e em seguida o seu volume reduzido a cerca de 10-20 % do volume inicial, por concentração num evaporador rotativo à temperatura de 30 °C. O extrato resultante foi em seguida tratado enzimaticamente com α -amilase (3000 U/mL) para remover o amido. Desta forma, utilizou-se cerca de 50 μ L de α -amilase por cada 10 g de *Ulva rigida* inicial e colocou-se sob agitação leve, durante 30 min, à temperatura ambiente ou próximo de 20 °C. Após este período, os polissacarídeos do extrato aquoso foram precipitados com quatro volumes de etanol, durante 24 h na câmara fria, à temperatura de 4 °C. Decorrido este tempo, o precipitado foi recuperado por filtração com filtro de papel, lavado duas vezes com etanol a 96 % (v/v), uma vez com acetona pura e, por fim, uma vez com éter dietílico, tendo sido deixado a secar na estufa *overnight*, à temperatura de 40 °C. O rendimento de extração foi calculado com base no quociente entre a massa final do extrato e a massa inicial de alga em base seca.

2.3.3. Análise de açúcares neutros

A análise de açúcares neutros consiste numa hidrólise ácida dos polissacarídeos segundo o procedimento descrito por Selvendran *et al.* (86). Nesta análise, os resíduos são

convertidos em acetatos de alditol (AA), derivados voláteis e termoestáveis, que possibilitam a análise qualitativa e quantitativa dos resíduos de açúcar por GC-FID (87).

Para o processo de hidrólise pesaram-se, em triplicado, 2-3 mg de AIR para tubos de cultura. Adicionaram-se 200 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (v/v) e incubaram-se à temperatura ambiente durante 3 h, agitando-se duas a três vezes nesse mesmo espaço de tempo. De seguida, adicionaram-se 2,2 mL de água destilada a cada um dos tubos, perfazendo a concentração final de H₂SO₄ a 1 M, e deixou-se incubar a 100 °C num bloco de aquecimento. Após uma 1 h de reação, transferiram-se 0,5 mL de hidrolisado para quantificação de ácidos urónicos (ver ponto 2.3.4), deixando os restantes 1,9 mL a reagir por mais 1,5 h.

Após o processo de hidrólise, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionaram-se 200 µL de solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL) à amostra hidrolisada. De seguida, transferiu-se 1 mL de hidrolisado para novos tubos de cultura e neutralizou-se o ácido com 200 µL de NH₃ a 25%. Para redução dos resíduos a acetatos de alditol, adicionou-se 100 µL de solução de 15 % (m/v) NaBH₄ em NH₃ 3 M (preparada imediatamente antes da adição), agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 °C, durante 1 h.

Terminado o processo de redução, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e o excesso de NaBH₄ foi eliminado por 3 adições sucessivas de 50 µL de ácido acético glacial. Seguidamente transferiram-se 300 µL da solução anterior para tubos de sovirel, cujas tampas de teflon evitam contaminações da amostra e colocaram-se os tubos num banho de gelo. A cada tubo adicionou-se 450 µL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético (agente acetilante), agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 °C, durante 30 min. Em seguida, colocaram-se os tubos num banho de gelo e recuperam-se os acetatos de alditol através de uma extração líquido-líquido com 3 mL de água destilada (para decompor o excesso de anidrido acético, 1-metilimidazol e eliminar produtos hidrossolúveis indesejados) e 2,5 mL de diclorometano (para extrair os acetatos de alditol). Após agitação manual vigorosa dos tubos, estes centrifugaram-se a 3000 rpm durante 1 min, para haver a separação das duas fases. Aspirou-se a fase aquosa por sucção e à fase orgânica adicionou-se, novamente, 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se, centrifugou-se e removeu-se, novamente, a fase aquosa por sucção. De seguida, lavou-se a fase orgânica por duas adições consecutivas de 3 mL de água destilada intercaladas por agitação vigorosa,

centrifugação e aspiração da fase aquosa por sucção. Na última lavagem, certificou-se que a fase aquosa tinha sido removida cuidadosamente e transferiu-se a fase orgânica para tubos próprios de *speedvac*. Posteriormente, evaporou-se o diclorometano até à secura e lavou-se duas vezes com 1 mL de acetona anidra de modo a eliminar qualquer resíduo de água presente na amostra e evaporou-se novamente.

Para análise por GC-FID, os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µL de acetona anidra, sendo este volume dependente da concentração de resíduos da amostra. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC) através de um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 acoplado a um detetor de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura) e uma fase estacionária composta por cianopropilfenil e metilpolisiloxano na proporção de 1:1. O volume de injeção foi de 2 µL com a temperatura do injetor a 220 °C e a temperatura do detetor a 230°C, com *split* de 10 min. Analogamente, estabeleceu-se um programa de temperaturas com as seguintes condições: temperatura inicial de 200 °C, rampa de 40 °C/min até 220 °C, estabilização a 220 °C durante 7 min, rampa de 20 °C/min até 230 °C, e estabilização durante 1 min. O gás de arraste foi H₂ com uma pressão de 17 psi, sendo utilizado na chama do detetor ar e H₂ com um fluxo de 45 mL/min e 450 mL/min, respetivamente.

Os tempos de retenção dos acetatos de alditol presentes na amostra foram comparados com os tempos de retenção de padrões possibilitando, a identificação dos resíduos de açúcares presentes na amostra. Relativamente à quantificação destes açúcares, verifica-se que existe uma relação linear entre a área do pico obtido e a concentração do respetivo açúcar, sendo o fator de resposta 1.

2.3.4. Análise de ácidos urónicos

A análise de ácidos urónicos (UA) foi realizada através do método colorimétrico descrito por Selvendran *et al.* (86). Dado que esta determinação é efetuada através de um método colorimétrico, torna-se necessário realizar uma curva de calibração. Para tal, foram preparados cinco padrões com concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µg/mL, a partir de uma solução-mãe de ácido glucurónico com concentração de 200 µg/mL. Em seguida, à alíquota de 0,5 mL de hidrolisado recolhida na análise de açúcares neutros (ver ponto 2.3.3) adicionaram-se 2 mL de água destilada.

Posteriormente, para cada amostra e padrão foram preparados três tubos de ensaio, um branco e duas réplicas, cada um com 500 µL da respectiva solução. Todos os tubos de ensaio (os três tubos de cada amostra e os quinze tubos dos padrões) foram colocados num banho de gelo e adicionaram-se 3 mL de 50 mM de borato de sódio preparado em ácido sulfúrico concentrado. De forma cuidadosa, agitaram-se muito bem os tubos, taparam-se com folha de alumínio e colocaram-se num banho de água a 100 °C, durante 10 min. Após este período adicionou-se, no escuro, 100 µL de m-fenilfenol (MFF) 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH a dois dos três tubos de cada amostra e padrões (réplicas). O tubo ao qual não foi adicionado MFF corresponde ao branco de cada amostra ou padrão. De seguida agitaram-se, novamente, muito bem os tubos de forma cuidadosa e o mais homogênea possível e deixaram-se a reagir, no escuro, durante 30 min. Decorrido o tempo de reação, agitaram-se os tubos e transferiram-se 300 µL de cada amostra e padrão, em duplicado, para uma microplaca de plástico de 96 poços. Em seguida, leram-se as respectivas absorvâncias ao comprimento de onda de 520 nm contra o ar recorrendo a um leitor de microplacas Biotek Eon. De realçar que ao valor de absorvância das amostras e padrões foi subtraído o valor de absorvância do respetivo branco.

2.3.5. Análise das ligações glicosídicas

A análise das ligações glicosídicas dos resíduos das ulvanas extraídas (ver ponto 2.3.2) foi determinada pela análise de acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA), por adaptação do método de Ciucanu e Kerek (88). De uma forma geral, este método consiste na metilação dos grupos hidroxilo livres, originando éteres metílicos devido à reação do polissacarídeo dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), na presença de uma base forte (NaOH) e de um agente metilante (CH₃I). Após esta reação, os polissacarídeos são submetidos a uma hidrólise ácida que expõe os grupos que estavam envolvidos nas ligações glicosídicas, os quais são submetidos a redução e acetilação. Desta forma, origina-se os PMAA que podem ser identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa com analisador quadropolo (GC-qMS).

Inicialmente pesou-se 1-2 mg de amostra para tubos de *speedvac* com septo na tampa e colocaram-se a secar na estufa de vazio *overnight*, na presença de pentóxido de fósforo (P₂O₅). Após este período adicionou-se a cada tubo 1 mL de DMSO (seco com peneiros moleculares 3 Å) e deixou-se em agitação *overnight*, à temperatura ambiente, para a dissolução completa da amostra. De seguida tritaram-se algumas palhetas de NaOH num

almofariz, sob atmosfera corrente de árgon até se obter um pó fino, adicionando-se cerca de 40 mg a cada tubo. Deixou-se a reagir durante 30 min com agitação magnética contínua e à temperatura ambiente. Após este tempo de espera, adicionou-se 80 µL de CH₃I a cada tubo com uma seringa e deixou-se reagir durante 20 min com agitação magnética vigorosa. Repetiu-se a adição de CH₃I por mais duas adições sucessivas, intercaladas com um tempo de reação de 20 min com agitação vigorosa e adicionou-se a cada tubo 3 mL de uma solução de clorofórmio e metanol (CHCl₃:MeOH, 1:1 v/v). De seguida, dialisou-se as amostras em membranas de poro 12-14 kDa contra uma solução etanol e água destilada (EtOH:H₂O, 1:1 v/v). Após mudança da solução de diálise, pelo menos três vezes, transferiram-se as amostras para tubos de speedvac e concentraram-se até à secura. Posteriormente, para garantir a completa metilação, dissolveram-se novamente as amostras em 1 mL de DMSO e repetiu-se todos os passos anteriores até à concentração das amostras na *speedvac*.

Após a remetilação das amostras, adicionaram-se 500 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 2 M e incubou-se a 121 °C durante 1 h, agitando-se os tubos duas a três vezes durante este espaço de tempo. Após este período evaporou-se o TFA na *speedvac* até à secura e iniciou-se o processo de redução das amostras. Para isso, adicionou-se 300 µL de NH₃ 2 M e 20 mg de NaBD₄, deixando-se a reagir a 30 °C durante 1 h. Os tubos foram arrefecidos, de seguida, num banho de gelo e o excesso de NaBD₄ foi neutralizado com duas adições sucessivas de 50 µL de ácido acético glacial.

Para a reação de acetilação, a cada tubo adicionou-se 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, agitou-se bem e incubou-se um bloco de aquecimento a 30 °C, durante 30 min. Em seguida, colocaram-se os tubos num banho de gelo e removeram-se os acetatos de alditol através de uma extração líquido-líquido com 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Após agitação manual vigorosa dos tubos, estes centrifugaram-se a 3000 rpm durante 1 min, originando uma separação de duas fases. Aspirou-se a fase aquosa por sucção e à fase orgânica adicionou-se, novamente, 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se, centrifugou-se e removeu-se, novamente, a fase aquosa por sucção. De seguida, lavou-se a fase orgânica por duas adições consecutivas de 3 mL de água destilada intercaladas por agitação vigorosa, centrifugação e aspiração da fase aquosa por sucção. Na última lavagem, certificou-se que a fase aquosa tinha sido removida cuidadosamente e evaporou-se o diclorometano até à secura, lavando-se duas vezes com 1 mL de acetona anidra.

Por fim, os PMAA foram dissolvidos em 50 μ L de acetona anidra e analisados por GC-qMS utilizando um cromatógrafo GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu com uma coluna capilar DB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μ m de espessura). Injetou-se 0,5 μ L de cada amostra com a temperatura do injetor a 250 °C e a temperatura do detetor a 300 °C. Analogamente, estabeleceu-se um programa de temperaturas com as seguintes condições: temperatura inicial de 80 °C, rampa de 10 °C/min até 140 °C, estabilização a 220 °C durante 5 min; rampa de 0,2 °C/min até 151,8 °C, seguido de rampa de 60 °C/min até 250 °C onde permanece durante 2 min, sendo o tempo total de análise de 62 min. Relativamente ao espectrómetro de massa, a energia de ionização foi -70 eV, a temperatura da fonte de ionização 250 °C, a interface 300 °C, tendo os espectros sido adquiridos na gama de relações m/z entre 50 e 700.

2.3.6. Dessulfatação

A dessulfatação é um processo que permite a determinação dos locais de ligação dos grupos sulfato nos resíduos de açúcar, tal como descrito por Miller *et al.* (89). Dada a difícil dissolução da amostra durante os passos iniciais do procedimento, decidiu-se utilizar metade da quantidade de amostra e de ácido 1,2,4,5-benzenotetracarboxílico (ácido piromelítico) em relação ao método descrito (89).

Desta forma, pesou-se 5 mg de amostra para um tubo de *speedvac* e adicionou-se 1,8 mL de DMSO até à dissolução completa da amostra. Às amostras totalmente dissolvidas adicionou-se 100 μ L de piridina (catalisador da reação) e 6,5 mg de ácido piromelítico, responsável pela hidrólise das ligações tioéster. De seguida adicionou-se 12 mg de fluoreto de sódio (NaF), responsável por complexar com os sulfatos que ficam livres, e 200 μ L de piridina. Incubou-se a 120 °C num bloco de aquecimento durante 3 h e após este período deixou-se arrefecer os tubos à temperatura ambiente. Após o arrefecimento, adicionou-se a cada tubo 1 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 3% (m/v) e dialisou-se as amostras em membranas de poro 12-14 kDa contra uma solução de água destilada com umas gotas de tolueno e clorofórmio. Após mudança da solução de diálise, pelo menos três vezes, transferiram-se as amostras para tubos de *speedvac*, congelou-se e liofilizou-se. As amostras dessulfatadas foram em seguida metiladas, tal como descrito no ponto 2.3.5, de modo a ser possível identificar os locais de ligação dos ésteres de sulfato por comparação com a análise de metilação das amostras iniciais de extração de ulvanas.

2.4. Tratamento estatístico

A análise estatística dos resultados foi efetuada através do programa *GraphPad Prism*, versão 6.01, utilizando a análise de variância *One-way ANOVA*, seguida pelo Teste de *Tukey* (*Tukey's multiple comparisons test*) que efetua comparações múltiplas entre a média das diferentes condições de cultivo para os vários parâmetros nutricionais estudados. Diferenças entre as médias de, pelo menos, 5 % ($p\text{-value} < 0,05$) foram consideradas significativas. Dada a multiplicidade de comparações obtidas pelo Teste de *Tukey*, apenas foram consideradas, para o primeiro desenho experimental, as comparações entre a mesma DC/diferente TR e diferente DC/igual TR, separadamente, para o mês de setembro e janeiro, assim como as comparações entre as mesmas condições em ambos os meses (*ie*, LL_{Set} vs. LL_{Jan}). Para o segundo desenho experimental foram consideradas as mesmas comparações, mas envolvendo o tipo de água e não a TR, assim como as comparações entre as mesmas condições foram efetuadas entre os três tempos diferentes (T0 vs. T15, T0 vs. T21 e T15 vs. T21).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização nutricional do primeiro desenho experimental

A realização do primeiro desenho experimental visou compreender o efeito da modulação da densidade de cultivo (DC) e da taxa de renovação de água (TR) no perfil nutricional da alga verde *Ulva rigida*, cultivada num sistema de aquacultura integrada multi-trófica (IMTA). Para tal, considerou-se duas estações do ano diferentes, nomeadamente, o verão (setembro) e o inverno (janeiro) e para cada condição de cultivo foram estabelecidas uma densidade e uma taxa de renovação baixa e alta, originando no total quatro condições de cultivo, testadas em triplicado. Posteriormente, as análises aos parâmetros nutricionais foram realizadas, encontrando-se os resultados expressos nos próximos subcapítulos.

3.1.1. Monitorização das condições ambientais

No âmbito do estágio realizado na ALGAplus, Lda., um dos objetivos estabelecidos consistiu na monitorização dos parâmetros ambientais, nomeadamente, da temperatura, salinidade e pH, dos tanques de cultivo pertencentes ao primeiro desenho experimental. A monitorização destes parâmetros ocorreu no período de novembro de 2016 a julho de 2017, tendo sido realizada, aleatoriamente, em vários dias de cada mês. Na Figura 10, está representado a variação da temperatura, salinidade e pH, ao longo do período estabelecido, para as diferentes condições de cultivo LL, LH, HL e HH.

Relativamente à temperatura, as quatro condições de cultivo evidenciaram, aproximadamente, valores idênticos entre si, variando de novembro a julho entre 14,4-23,3 °C. Durante este período, foi verificada uma diminuição gradual da temperatura durante a estação de inverno, atingindo o mínimo em janeiro (9,8 °C), a partir do qual foi verificado um aumento gradual ao longo da estação da primavera e verão, à exceção do mês de maio. De acordo com o esperado, as temperaturas mais baixas foram registadas durante o inverno, enquanto as temperaturas mais elevadas foram registadas na primavera e início de verão. Analogamente à temperatura, o parâmetro salinidade não evidenciou diferenças entre as quatro condições de cultivo, variando de novembro a julho entre 36,0-41,6 ‰. Durante este período, foi observada uma diminuição gradual da salinidade, atingindo o mínimo em fevereiro (29,1 ‰) a partir do qual foi verificado um aumento gradual ao longo da primavera e do verão. Os resultados sugerem que a menor concentração de sais foi registada no final do inverno, altura em que a taxa de precipitação foi mais elevada, o que origina, por sua vez, uma ligeira diluição da quantidade de sais presentes na água de cultivo. Em contrapartida,

pela tendência dos resultados sugere-se que a maior concentração de sais observada durante a estação do verão possa ser uma consequência do aumento da temperatura nessa altura do ano, podendo esta ter induzido um aumento da taxa de evaporação da água.

O pH foi o parâmetro que registou uma variação mais evidente entre as diferentes condições de cultivo. Durante o período de novembro a julho, o pH variou, para as quatro condições de cultivo, entre 8,00-8,80, registando-se um aumento gradual deste parâmetro, atingindo o máximo em maio (9,00), a partir do qual diminuiu ligeiramente. Esta variação pode ser explicada, principalmente, com base na quantidade de CO₂ dissolvido na água de cultivo da *Ulva rigida*. De facto, durante o inverno, a diminuição do fotoperíodo resulta numa menor atividade fotossintética por parte das macroalgas. Consequentemente, a quantidade de CO₂ dissolvido na água é superior resultando na diminuição do pH. Em contrapartida, durante a primavera e, posteriormente, do verão, o aumento gradual do fotoperíodo origina uma atividade fotossintética cada vez maior, resultando na diminuição da quantidade de CO₂ dissolvido e no aumento do ião carbonato (CO₃²⁻) que, por sua vez, induz o aumento do pH.

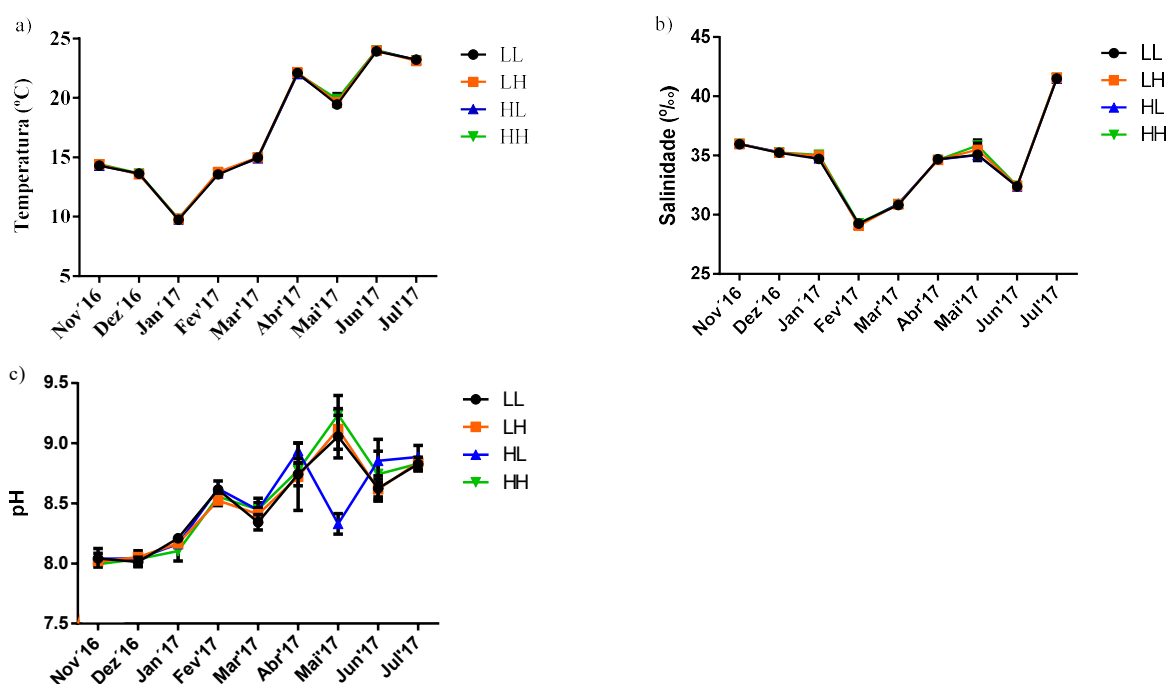


Figura 10. Variação média mensal da a) temperatura, b) salinidade e c) pH dos tanques de cultivo da *Ulva rigida* referentes às condições de cultivo LL, LH, HL e HH, no período de novembro de 2016 a julho de 2017. (‰ – permilagem)

3.1.2. Teor de Humidade relativa e resíduo sólido

O teor de humidade é um parâmetro que tem um grande impacto na estabilidade, na qualidade e na composição dos alimentos, podendo afetar, por exemplo, o seu tempo de armazenamento (90). A água está presente nos alimentos sob diferentes formas, no entanto de acordo com o método utilizado, apenas é determinada a água livre que se encontra no alimento. Na Figura 11 está representado o teor de humidade relativa e resíduo sólido da *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes (LL, LH, HL e HH).

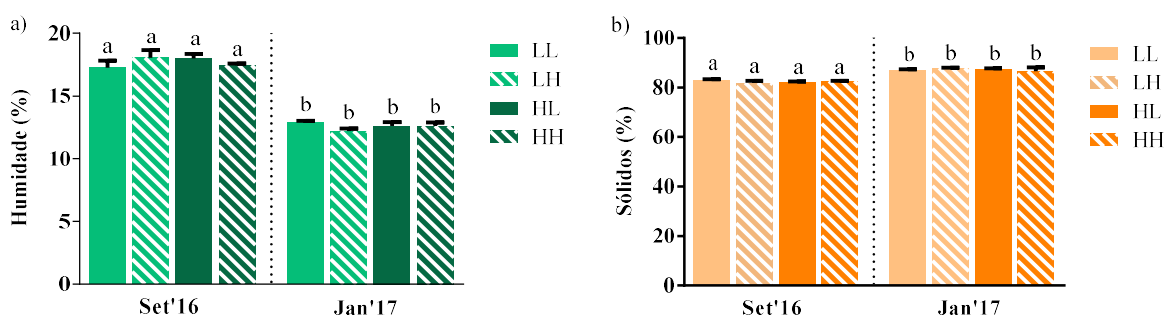


Figura 11. Teor de humidade relativa (a) e resíduo sólido (b), em percentagem, da *Ulva rigida* seca nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão. ^{a, b} letras diferentes em comum indicam diferenças significativas

Relativamente ao mês de setembro e janeiro, as condições LL, LH, HL e HH exibiram teores de humidade relativa entre 17,2-18,0 % e 12,2-12,6 %, respetivamente. Desta forma, verifica-se que tanto no mês de setembro como no mês de janeiro, os teores de humidade são idênticos entre as diferentes condições, porém o mês de setembro apresenta em média um teor de humidade significativamente superior ($17,7 \pm 0,4$ %) ao mês de janeiro ($12,6 \pm 0,3$ %). Esta diferença poderá ser explicada tendo em conta o processamento da *Ulva rigida* na ALGApplus, Lda, dado que o teor de humidade da alga pode variar de acordo com o tempo de secagem, humidade do ar e quantidade de biomassa no interior do secador.

Analogamente à percentagem de humidade, o resíduo sólido (*i.e.*, todos os constituintes do alimento à exceção da água livre) também se demonstrou idêntico entre as diferentes condições de cultivo, variando em setembro e janeiro entre 82,0-82,8 % e 87,2-87,8 %, respetivamente. Contrariamente ao teor de humidade, a percentagem de sólidos no mês de janeiro ($87,4 \pm 0,3$ %) demonstrou-se significativamente superior à de setembro ($82,3$

$\pm 0,4 \%$) dado que este parâmetro é obtido a partir do cálculo da humidade. Desta forma, os resultados globais indicam que as diferentes DC e TR não influenciam o teor de humidade e de sólidos da *Ulva rigida* processada, sendo apenas dependente das condições de processamento (secagem) utilizadas na empresa.

3.1.3. Teor de cinzas

As cinzas de um alimento referem-se ao resíduo inorgânico remanescente após a completa destruição da sua matriz orgânica. Na Figura 12 está representado o teor de cinzas da *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes (LL, LH, HL e HH).

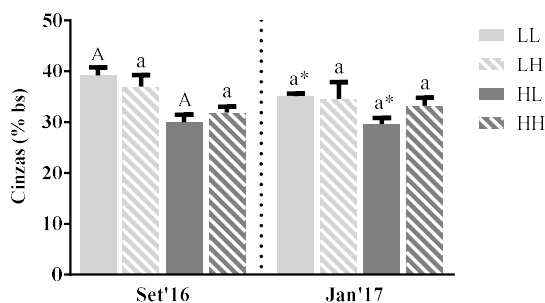


Figura 12. Teor de cinzas, em percentagem de base seca, da *Ulva rigida* nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão. ^{a, b} letras diferentes em comum indicam diferenças significativas; ^{A, A} letras maiúsculas em comum indicam diferenças significativas; *condições com o mesmo número de asteriscos indicam diferenças significativas

Relativamente ao mês de setembro, os resultados obtidos para as condições LL, LH, HL e HH foram $38,0 \pm 2,4$, $37,0 \pm 2,2$, $30,0 \pm 1,5$ e $31,9 \pm 1,1 \%$, respetivamente. Quanto ao mês de janeiro, os resultados obtidos para as mesmas condições foram, respetivamente, $35,1 \pm 0,5$, $34,5 \pm 3,3$, $29,7 \pm 1,1$ e $33,2 \pm 1,6 \%$. De acordo com a literatura, estes resultados evidenciaram-se superiores relativamente aos resultados obtidos para outras espécies pertencentes ao género *Ulva* (10-30 % bs) (91–93).

Tendo em conta apenas as diferenças entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para os meses de setembro e janeiro, os resultados sugerem que a TR não influenciou a acumulação de cinzas, uma vez que, a comparação entre as condições com TR diferentes (LL vs. LH e HL vs. HH) não evidenciou diferenças significativas. Em contrapartida, os resultados sugerem que a DC teve um impacto positivo na acumulação de cinzas comparativamente à TR, dado que a comparação entre as condições com diferentes

DC e baixa TR (LL vs. HL) se evidenciou significativamente diferente. Avaliando ambas as DC, os resultados sugerem que o teor de cinzas é, especialmente, influenciado pela baixa densidade (condições LL e LH), em que se verifica uma maior acumulação de cinzas do que na alta densidade (condições HL e HH). A tendência anteriormente descrita é verificada para ambos os meses, sugerindo-se que a baixa densidade conjugada com a alta TR parece ser a melhor combinação de condições para a obtenção da *Ulva rigida* com um teor de cinzas mais elevado.

A análise de resultados anteriormente descrita apenas se referiu às diferenças existentes entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para os meses de setembro e janeiro. Contudo, tornou-se necessário compreender o efeito da sazonalidade no teor de cinzas e qual a condição de cultivo mais propícia para esta acumulação. Desta forma, avaliando a comparação entre as mesmas condições em setembro e janeiro, não se verificaram diferenças significativas, sugerindo que, quantitativamente, o conteúdo de cinzas é o mesmo em ambos os meses.

Assim, os resultados permitem concluir que a TR não influencia o conteúdo de cinzas em ambos os meses, no entanto a densidade de cultivo evidencia ter um efeito positivo no seu conteúdo, especialmente a baixa densidade. De facto, a média do teor de cinzas de setembro e janeiro foi de cerca de $34,2 \pm 3,9$ e $33,1 \pm 2,4$ %, respetivamente, sugerindo que no final do verão (setembro) e início do inverno (janeiro) o teor de cinzas em média é igual. Desta forma, para averiguar o efeito prolongado da sazonalidade no teor de cinzas sugere-se a avaliação de outros meses representativos das restantes estações do ano. Tendo em conta as condições de cultivo, os resultados permitem concluir que independentemente de não se verificar uma diferença em média do conteúdo de cinzas em setembro e janeiro, a condição LL (\downarrow DC e \downarrow Tr) poderá surgir como uma potencial candidata caso o objetivo seja comercializar a *Ulva rigida* com o maior teor de cinzas.

3.1.4. Teor de azoto e proteína

Paralelamente à análise do teor de cinzas, procedeu-se à determinação do teor de azoto por análise elementar e do teor de proteína, considerando o fator de conversão 6,25. Recentemente, alguns autores (94–96) têm utilizado o fator 5,00 para a conversão da proteína em algas, porém de modo a facilitar a comparação dos resultados com a literatura utilizou-se o fator de *Kjeldahl* (6,25). Na Figura 13 está representado o respetivo teor de azoto e

proteína da *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes (LL, LH, HL e HH).

Relativamente ao mês de setembro, o teor de azoto obtido para as condições LL, LH, HL e HH variou entre 1,9-3,0 % bs correspondente a uma variação do teor de proteína entre 13,2-20,9 % bs. Quanto ao mês de janeiro, as mesmas condições apresentaram uma variação do teor de azoto e de proteína correspondente a 2,4-3,3 e 17,6-23,5 % bs, respetivamente.

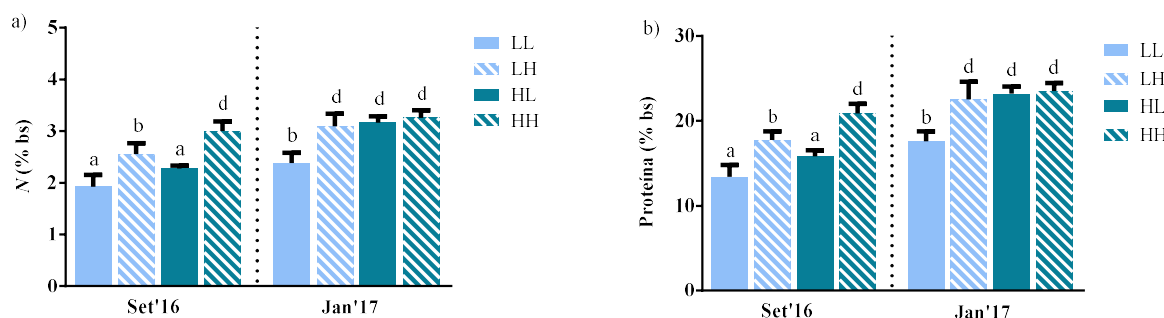


Figura 13. Teor de azoto (a) e proteína (b), em percentagem de base seca, da *Ulva rigida* nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes LL, LH, HL e HH.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão. ^{a, b, d} letras diferentes em comum indicam diferenças significativas;

A partir dos resultados para as diferentes condições calculou-se o teor médio de azoto correspondente a $2,4 \pm 0,5$ e $3,0 \pm 0,4$ % bs e, o teor médio de proteína correspondente a $17,0 \pm 3,1$ e $21,7 \pm 2,8$ % bs, para os respetivos meses de setembro e janeiro. De notar que ao longo da discussão dos resultados será utilizado o parâmetro teor proteico ao invés do teor de azoto, dado que a maioria da literatura expressa os seus resultados em termos de proteína. Os resultados obtidos relativamente ao teor de proteína, nos meses de setembro e janeiro, encontram-se de acordo com os resultados descritos na literatura para a maioria das espécies de *Ulva spp.* selvagens. Deste modo e a título de exemplo, Pena-Rodriguez *et al.* (93) ao avaliar o perfil nutricional de *Ulva clathrata*, no período de dezembro a abril, registou um teor proteico compreendido entre 20-26 % bs. Analogamente, Khairy *et al.* (91) ao avaliar o efeito da sazonalidade no perfil nutricional de *Ulva lactuca* observou, no mês representativo da estação do verão, um teor proteico próximo de 18 % bs. Contudo, Shuuluka *et al.*, (97) ao estudar o perfil nutricional de *Ulva rigida* verificou a presença de cerca de 22 % bs de proteína em janeiro. De facto, os valores de proteína descritos para as diferentes espécies de *Ulva* selvagens (91,93,97), provenientes de várias localizações, são comparáveis

aos resultados obtidos para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA. Porém torna-se importante realçar a escassez de estudos que avaliem o perfil nutricional e, mais concretamente, o conteúdo de proteína de *Ulva rigida* cultivada em sistema de aquacultura integrada.

Considerando apenas as diferenças entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para o mês de setembro e janeiro, os resultados sugerem que a TR teve um maior efeito na acumulação de proteína comparativamente à DC. De facto, o número de diferenças significativas existentes aquando da comparação entre as condições com a mesma TR e diferente DC (LL vs. HL e LH vs. HH), em ambos os meses, foi menor relativamente à comparação entre as condições com a mesma DC e diferente TR. Adicionalmente, a condição em que se verificou um maior conteúdo de proteína, para ambos os meses, foi a condição HH, correspondente à maior densidade e TR. Em contrapartida, a condição em que se obteve um menor conteúdo proteico, em setembro e janeiro, foi a condição LL, correspondente à menor densidade e TR. A crescente acumulação tecidual de azoto em algas verdes (10,98) e vermelhas (8,9) cultivadas na presença de elevadas concentrações de nutrientes tem sido reportada por vários autores, dado que a maior disponibilidade de azoto no meio resulta numa maior assimilação de azoto por parte da macroalga e, consequentemente, de compostos azotados. Além disso, um estudo realizado por Neori *et al.* (99) demonstrou a existência de uma correlação positiva entre o teor de azoto e/ou proteína e a densidade de cultivo para diferentes espécies de macroalgas pertencentes ao género *Ulva* cultivadas em IMTA (100). Desta forma, os resultados sugerem que, para ambos os meses, o teor de proteína da *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA pode ser potencialmente aumentado estabelecendo a taxa de renovação num modo elevado conjugada com uma menor ou maior densidade de cultivo.

Analogamente, o efeito da sazonalidade no teor de proteína de *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA foi avaliado tendo em conta as diferenças existentes entre a comparação das mesmas condições em ambos os meses. Os resultados evidenciaram que o teor de proteína foi significativamente diferente e superior entre a comparação das condições LL, LH e HL para ambos os meses, à exceção da condição HH. Consequentemente, tornou-se necessário compreender a razão pela qual o teor de proteína foi mais elevado em janeiro e qual o papel da sazonalidade no aumento deste parâmetro nutricional. Desta forma, considerando o mês de setembro representativo da estação de verão e o mês de janeiro

representativo da estação de inverno, a existência de determinadas condições ambientais características destas estações do ano condicionam não só a sobrevivência das macroalgas, como também a sua reprodução e composição nutricional (101). Durante a estação de verão, a maior durabilidade dos dias resulta num fotoperíodo mais longo, contribuindo para uma maior exposição das macroalgas à luminosidade e temperatura. Em contrapartida na estação de inverno, a menor durabilidade dos dias resulta num fotoperíodo mais curto comparativamente à estação de verão, contribuindo para uma maior exposição das macroalgas a menores períodos de luminosidade e a temperaturas mais baixas. De facto, a conjugação das temperaturas mais baixas características do inverno com a menor duração do dia resulta num menor crescimento das macroalgas comparativamente à estação de verão o que, por sua vez, origina uma maior acumulação de nutrientes no meio de cultivo. Este último facto é ainda mais acentuado dado que no inverno a ocorrência da mistura de massas de água nos mares e oceanos proporciona a ascensão dos nutrientes às camadas mais superficiais de água devido essencialmente à diminuição da temperatura. Desta forma, a maior exposição das macroalgas a um maior teor de nutrientes no meio resulta na sua assimilação e aumento do seu valor nutricional em termos proteicos.

Assim a exposição da *Ulva rigida*, cultivada em sistema de IMTA, a uma elevada DC e TR (condição HH) resulta na maior acumulação de azoto por parte da macroalga e, consequentemente, na elevação do seu conteúdo proteico. A maior assimilação de azoto quando a macroalga é exposta a uma maior concentração de nutrientes, poderá justificar o facto da *Ulva rigida* possuir maiores teores de proteína em janeiro (inverno), estação em que a sazonalidade desempenha um papel muito importante. De facto, o sistema de IMTA quando conjugado com diferentes condições de cultivo constitui uma potencial técnica capaz de manipular o conteúdo proteico de *Ulva rigida*, podendo assim elevar o seu valor nutricional e a sua rentabilidade no mercado.

3.1.5. Cor superficial

Paralelamente à análise do conteúdo proteico, procedeu-se à determinação dos parâmetros de cor superficial definidos pelo espaço de cor CIE-L*a*b*, obtendo-se ainda de forma indireta os parâmetros ΔE^* e índice de acastanhamento (IA). Na Figura 14 estão representados os valores médios e respetivo desvio-padrão relativos aos parâmetros L*, a*

e b* da *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as quatro condições de cultivo diferentes (LL, LH, HL e HH).

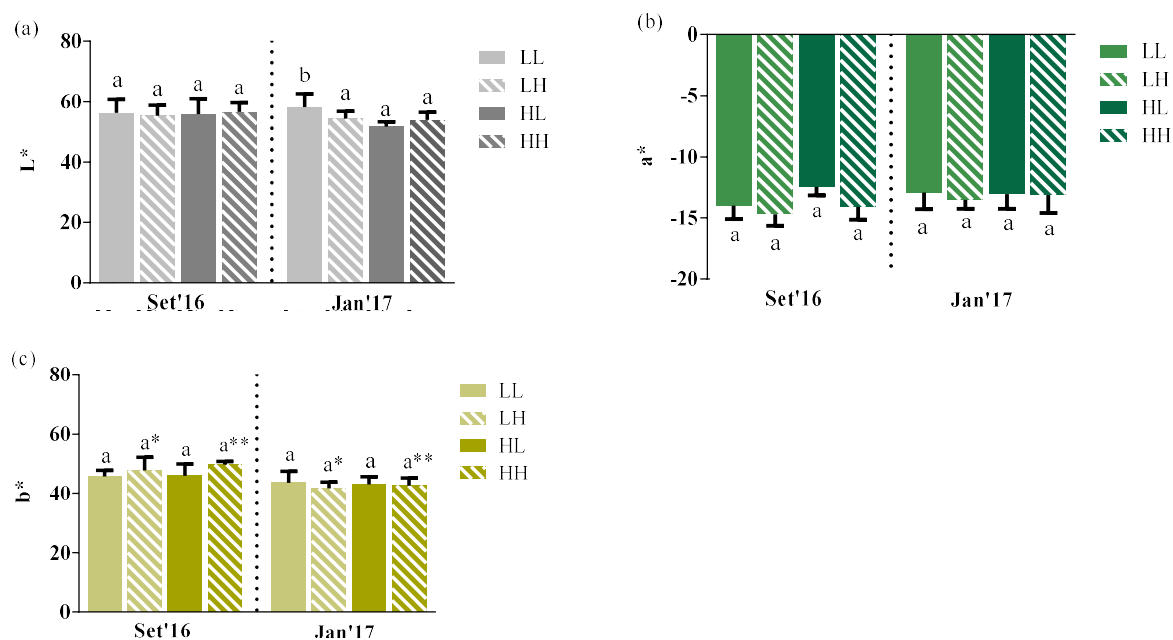


Figura 14. Valores médios e respetivo desvio-padrão dos parâmetros de cor a) L*, b) a* e c) b* para a *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as diferentes condições de cultivo LL, LH, HL e HH.

Nota: os valores resultam da média de três medições ± desvio-padrão. ^{a, b} letras diferentes em comum indicam diferenças significativas; *, ** condições com o mesmo número de asteriscos indicam diferenças significativas

Os valores médios de luminosidade (Figura 14 (a)) obtidos para as condições LL, LH, HL e HH no mês de setembro e janeiro variaram entre 55,3-56,6 e 51,8-59,1, respetivamente. Os resultados obtidos indicam que entre as diferentes condições de cultivo, separadamente, para os meses de setembro e janeiro, não se verificaram diferenças significativas, à exceção das comparações entre LL vs. LH e LL vs. HL em janeiro. De facto, as diferenças significativas associadas à condição LL de janeiro sugerem que o maior valor de L* torna a *Ulva rigida* mais clara (menos escura) comparativamente às restantes condições. Desta forma, os resultados indicam que, de uma forma geral, para ambos os meses a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA sob diferentes condições de cultivo apresentou, aproximadamente, a mesma medida de luminosidade.

Segundo a Figura 14 (b), os valores médios obtidos referentes ao parâmetro a*, para as condições LL, LH, HL e HH, no mês de setembro e janeiro, variaram entre -12,5–-14,7 e -12,1–-13,5, respetivamente. Quanto ao parâmetro b* representado na Figura 14 (c), os valores médios obtidos para as condições LL, LH, HL e HH, no mês de setembro e janeiro,

variaram entre 46,0-49,7 e 41,7-43,6, respetivamente. Os resultados obtidos indicam que, separadamente, para o mês de setembro e janeiro, as coordenadas cromáticas a^* e b^* pertencentes ao espaço de cor CIE-L*a*b* permaneceram idênticas entre as diferentes condições. Adicionalmente, de modo a avaliar o efeito da sazonalidade na cor da *Ulva rigida* compararam-se as mesmas condições em ambos os meses, não se tendo verificado diferenças significativas para o parâmetro a^* . Contudo, para o parâmetro b^* apenas foram observadas diferenças significativas entre a comparação das condições LH_{Set} vs. LH_{Jan} e HH_{Set} vs. HH_{Jan}, não se tendo verificado diferenças para as restantes condições. De facto, as diferenças significativas anteriormente mencionadas indicam que nas respetivas condições a *Ulva rigida* teve uma coloração menos amarelada em janeiro comparativamente à condição equivalente em setembro, devido ao menor valor de b^* em janeiro. Assim sendo, os resultados sugerem que no mês de janeiro existe uma tendência para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA ser menos amarelada do que em setembro, dado que algumas condições apresentaram menores valores de b^* comparativamente a setembro.

Concluindo, o espaço de cor CIE-L*a*b* permitiu avaliar a luminosidade e as coordenadas cromáticas relativamente à *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA sob diferentes condições. Relativamente ao efeito das diferentes condições de cultivo na cor superficial da *Ulva rigida*, separadamente, para o mês de setembro e janeiro, apenas a condição LL em janeiro apresentou ser mais clara relativamente às restantes, permanecendo as coordenadas cromáticas a^* e b^* inalteradas. Em contrapartida, a sazonalidade não aparenta influenciar a luminosidade e o parâmetro a^* , porém sugere ter um efeito no parâmetro b^* , dada a coloração menos amarelada da *Ulva rigida* observada em janeiro em relação às mesmas condições em setembro.

Paralelamente à determinação dos parâmetros de luminosidade e coordenadas cromáticas pertencentes ao espaço de cor CIE-L*a*b*, procedeu-se à determinação do parâmetro ΔE^* . Na Tabela 3 estão representados os respetivos ΔE^* referentes às comparações efetuadas entre as quatro condições de cultivo (LL, LH, HL e HH) para a *Ulva rigida* nos meses de setembro e janeiro.

Tabela 3. Valores de ΔE^* correspondentes às comparações efetuadas entre as diferentes condições de cultivo para a *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro.

Comparação	ΔE^*	
	Setembro (U1.3816)	Janeiro (U1.0317)
Igual DC e Diferente TR		
LL vs. LH	2,17	5,16
HL vs. HH	4,15	2,21
Diferente DC e Igual TR		
LL vs. HL	1,61	7,39
LH vs. HH	2,37	1,06
Mesmas Condições		
LL _{Set} vs. LL _{Jan}	4,37	
LH _{Set} vs. LH _{Jan}	7,16	
HL _{Set} vs. HL _{Jan}	5,26	
HH _{Set} vs. HH _{Jan}	7,66	

A determinação dos parâmetros L^* , a^* e b^* pertencentes ao espaço de cor CIE- $L^*a^*b^*$ e, posteriormente, da diferença de cor entre as quatro condições de cultivo tornou-se pertinente dado que a cor superficial das macroalgas constitui não só um parâmetro de qualidade, mas também pode ser indicativa do teor de proteína presente nas macroalgas (50). No subcapítulo 3.1.4, verificou-se que a maior disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo das macroalgas influencia de forma positiva o seu teor de proteína. Adicionalmente, sabe-se que a cor superficial das algas está diretamente relacionada com o teor de pigmentos fotossintéticos, principalmente, de clorofila *a*, e a sua biossíntese depende da concentração do aminoácido glutamato na célula vegetal. Desta forma, torna-se claro que o estabelecimento de condições que promovam a renovação do meio de cultivo e uma exposição da alga a maiores concentrações de nutrientes num determinado espaço de tempo, afeta a sua taxa de incorporação de azoto. Consequentemente, afeta a quantidade de aminoácidos (ácido glutâmico) e, por sua vez, o teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*). Portanto, as diferenças de cor calculadas entre as condições de cultivo em tempos diferentes relacionam-se com o teor de proteína da alga, isto é, se a diferença de proteína entre duas condições for elevada, então a diferença de cor também será.

Primeiramente, procedeu-se à análise das diferenças de cor expressas pelo ΔE^* entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para os meses de setembro e janeiro. Desta

forma, no mês de setembro verificou-se que a comparação entre as condições com igual DC e diferente TR evidenciou, em média, maiores diferenças quantitativas de cor comparativamente à comparação entre as condições com diferente DC e igual TR. Em contrapartida, no mês de janeiro, a comparação entre as condições com igual densidade e diferente taxa de renovação, assim como a comparação entre as condições com diferente densidade e igual taxa de renovação evidenciaram, em média, uma diferença de cor idêntica. De facto, no mês de janeiro, nenhuma das comparações efetuadas demonstrou, em média, um ΔE^* suficientemente superior e diferente que possa ser indicativo que uma das comparações seja responsável pela maior diferença de cor. Assim sendo, a análise dos ΔE^* entre as diferentes condições de cultivo, separadamente para os meses de setembro e janeiro, não permitiu definir de forma exata qual a melhor combinação de condições que originam uma maior diferença de cor para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA.

Tendo em conta o efeito da sazonalidade, as diferenças entre as mesmas condições para os meses de setembro e janeiro foram calculadas, verificando-se que o maior ΔE^* foi observado para a condição HH. De facto, em janeiro, a condição HH além de apresentar um maior teor de proteína, apresenta uma coloração menos amarelada comparativamente a setembro, o que poderá explicar a diferença de cor elevada. A comparação entre a condição LH evidenciou, igualmente, um ΔE^* considerável ainda que inferior à comparação anterior. Curiosamente a condição LH além de apresentar uma diferença de proteína elevada, possui também uma coloração menos amarelada, o que poderá explicar a elevada diferença de cor próxima da condição HH. As restantes condições (LL e HL) não evidenciaram ΔE^* tão elevados como as condições anteriores, dado que os parâmetros de cor não apresentaram diferenças tão evidentes, assim como a diferença do conteúdo de proteína em ambos os meses não foi tão elevada como nas comparações anteriores.

Concluindo, os resultados obtidos relativos às diferenças de cor para a *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA permitiram verificar que a condição em que se obteve um maior ΔE^* foi a HH. De facto, o teor de proteína e a coloração menos amarelada característica desta condição foram determinantes para que evidenciasse uma maior diferença de cor.

Adicionalmente, a partir dos parâmetros de cor CIE-L*a*b* foi possível determinar o índice de acastanhamento para as diferentes condições, em setembro e janeiro, estando os resultados evidenciados na Tabela 4. Os resultados indicaram que em setembro o IA variou,

aproximadamente, entre 116-133 e em janeiro entre 100-114, respetivamente. De facto, os resultados evidenciam que, de uma maneira geral, ocorreu uma diminuição do IA de setembro para janeiro entre as mesmas condições, no entanto estas diferenças não se evidenciaram significativas. Deste modo, as diferentes condições de cultivo não aparentam influenciar de forma significativa o índice de acastanhamento da *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA.

Tabela 4. Valores médios de índice de acastanhamento e respetivo desvio-padrão, para a *Ulva rigida*, nos meses de setembro e janeiro, para as diferentes condições de cultivo.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão. ^{a, b} letras diferentes em comum, na mesma linha, indicam diferenças significativas.

Condições	Setembro (U1.3816)	Janeiro (U1.0317)
LL	116,0 \pm 11,3 ^a	99,9 \pm 12,3 ^a
LH	132,7 \pm 9,4 ^a	112,3 \pm 8,9 ^a
HL	122,3 \pm 13,1 ^a	113,9 \pm 10,5 ^a
HH	130,9 \pm 10,4 ^a	111,4 \pm 12,2 ^a

3.2. Caracterização nutricional do segundo desenho experimental

A realização do segundo desenho experimental visou compreender o efeito da modulação de determinadas condições de cultivo, principalmente, no perfil de hidratos de carbono da alga verde *Ulva rigida* cultivada em sistema de IMTA. Desta forma foram testadas no mês de outubro, duas condições de cultivo diferentes, nomeadamente, a densidade de cultivo e o tipo de água, tal como descrito no ponto 2.1.2 da secção de Materiais e Métodos. Para cada condição estabeleceu-se uma densidade, baixa e alta, e um tipo de água, nova ou velha com diferentes teores de nutrientes, respetivamente, originando no total quatro condições de cultivo (LN, LO, HN e HO). Este desenho experimental teve uma duração de vinte e um dias, tendo sido recolhidas amostras no início da experiência (T0) e após quinze (T15) e vinte e um dias (T21) relativamente ao tempo inicial. Posteriormente, as análises aos parâmetros nutricionais foram realizadas, encontrando-se os resultados expressos nos próximos subcapítulos.

3.2.1. Teor de humidade relativa e resíduo sólido

Neste desenho experimental, o teor de humidade da *Ulva rigida* foi determinado na alga fresca dado que esta alga, após o cultivo, foi apenas lavada e congelada. Na Figura 15 está representado o teor de humidade relativa e resíduo sólido da *Ulva rigida* fresca, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO, no tempo inicial (T0) e após quinze (T15) e vinte e um dias (T21).

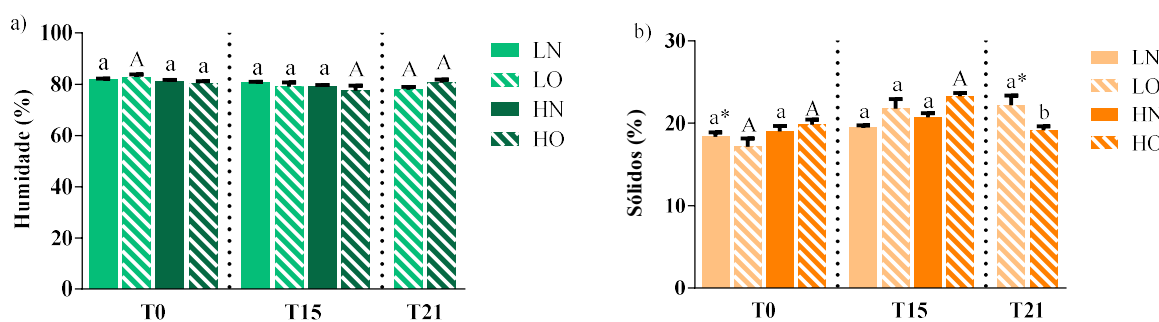


Figura 15. a) Teor de humidade relativa e b) resíduo sólido, em percentagem, da *Ulva rigida* fresca, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN, e HO em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão; ^{a, b} letras diferentes em comum indicam diferenças significativas; ^{A, A} letras maiúsculas em comum indicam diferenças significativas. *asterisco em comum indica diferenças significativas

Relativamente ao tempo inicial (T0), as condições LN, LO, HN e HO demonstraram teores de humidade e resíduo sólido idênticos entre si, compreendidos entre 80,5-82,8 e 17,2-19,8 %, respetivamente. Após quinze dias (T15), as mesmas condições apresentaram teores de humidade e resíduo sólido igualmente semelhantes compreendidos entre 77,5-80,6 e 19,4-23,3 %, respetivamente. Posteriormente, em T21 as condições LO e HO evidenciaram teores de humidade correspondentes a 77,8 e 80,6 %, respetivamente, e teores de resíduo sólido correspondentes a 22,2 e 19,2 %, respetivamente. De forma a facilitar a compreensão dos resultados, foi calculado o teor médio de humidade em T0, T15 e T21 correspondente a 81,5, 79,1 e 79,2 %, respetivamente, e o teor médio de resíduo sólido correspondente a 18,5, 21,3 e 20,7 %, respetivamente. Estes resultados encontraram-se de acordo com os observados por Bocanegra *et al.* (16) tendo sido verificado, em diferentes espécies de algas verdes frescas, um teor médio de humidade compreendido entre 80-90 %.

Os resultados indicaram que, em média, o teor de humidade e, consequentemente, o de resíduo sólido permaneceu, aproximadamente, idêntico entre as diferentes condições ao longo do tempo. Adicionalmente, as pequenas diferenças significativas observadas no teor de humidade e, consequentemente, no resíduo sólido, podem ser explicadas tendo em conta o próprio método de determinação deste parâmetro, uma vez que, o fornecimento da amostra fresca congelada, pode de certa forma originar uma ligeira variabilidade em termos de humidade entre as diferentes condições. Contudo, os resultados sugerem que as diferentes condições de cultivo, nomeadamente, a densidade de cultivo e o tipo de água não influenciaram o teor de humidade e, consequentemente, o de resíduo sólido da *Ulva rigida* cultivada ao longo do tempo.

3.2.2. Teor de cinzas

O teor de cinzas relativo à *Ulva rigida* cultivada sob este desenho experimental encontra-se representado na Figura 16, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO, no tempo inicial e após quinze e vinte e um dias.

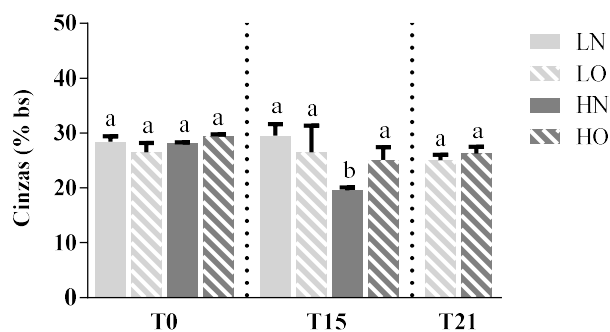


Figura 16. Teor de cinzas, em percentagem de base seca, da *Ulva rigida*, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão; ^a, ^b letras diferentes indicam diferenças significativas.

Relativamente ao tempo inicial (T0), os resultados obtidos para as condições LN, LO, HN e HO variaram entre 26,5-29,5 % bs. Após quinze dias (T15) as mesmas condições apresentaram teores de cinzas ligeiramente diferentes, correspondendo a $29,6 \pm 2,1$, $26,5 \pm 4,8$, $19,6 \pm 0,5$ e $25,1 \pm 2,3$ %, respetivamente, e após vinte e um dias as condições LO e HO evidenciaram teores de cinza correspondentes a $25,0 \pm 1,0$ e $26,2 \pm 1,2$ % bs, respetivamente. Estes resultados foram comparáveis aos existentes na literatura para diferentes espécies pertencentes ao género *Ulva* que evidenciaram possuir um teor de cinzas compreendido entre 12-28 % bs (5).

Os resultados obtidos para o T0 indicaram que o teor de cinzas entre as diferentes condições de cultivo foi igual, devido não só à inexistência de diferenças significativas, como também à igual proveniência das algas aquando do início da experiência. Contudo, em T15, a comparação entre as condições HN vs. HO e LN vs. HN evidenciaram diferenças significativas, contrariamente, à comparação entre as condições LN vs. LO e LO vs. HO. De realçar que o facto da condição HN em T15 apresentar, em média, um teor de cinzas mais baixo, poderá explicar todas as diferenças observadas. Quanto ao T21, a comparação entre as condições LO vs. HO não evidenciou diferenças significativas, sugerindo que neste tempo a densidade de cultivo não surtiu qualquer efeito neste parâmetro, dado que ambas foram testadas com o mesmo tipo de água. Desta forma, o baixo número de diferenças entre a comparação das quatro condições de cultivo, separadamente, para o T0, T15 e T21, não permitiu concluir se de facto as condições de cultivo tiveram algum impacto no teor de cinzas da *Ulva rigida*.

Posteriormente, de modo a averiguar o efeito do tempo no conteúdo de cinzas da *Ulva rigida* foram comparadas as mesmas condições em tempos diferentes. Para tal, a comparação entre o T0 e o T15 das condições LN, LO e HO não evidenciaram diferenças, contrariamente à comparação da condição HN. De facto, as comparações efetuadas relativamente à condição HN demonstraram que o teor de cinzas da *Ulva rigida* nesta condição diminuiu cerca de 10 % relativamente à sua condição equivalente no tempo inicial, possivelmente devido a alguma variabilidade no tanque de cultivo ou a uma lavagem da alga mais prolongada, após recolha, que possa ter influenciado o seu conteúdo de cinzas. Desta forma, a ausência de renovação de água durante a realização do desenho experimental, sugere que a concentração de sais presentes no meio de cultivo de *Ulva rigida* permaneceu idêntico ao longo do tempo. Este facto contribuiu para que, entre as diferentes condições de cultivo, a variação do teor de cinzas fosse mínima, ao longo do tempo. Assim sendo, a impossibilidade de observar uma variação coerente entre as diferentes condições, nas três amostragens, não permitiu verificar de forma conclusiva qual a melhor conjugação de condições de cultivo que permitissem originar uma *Ulva rigida* com maior teor de cinzas.

3.2.3. Teor de azoto e proteína

Analogamente, na Figura 17 estão representados os respetivos teores de azoto e proteína da *Ulva rigida*, para as quatro condições de cultivo diferentes (LN, LO, HN e HO) no tempo inicial, após quinze e vinte e um dias.

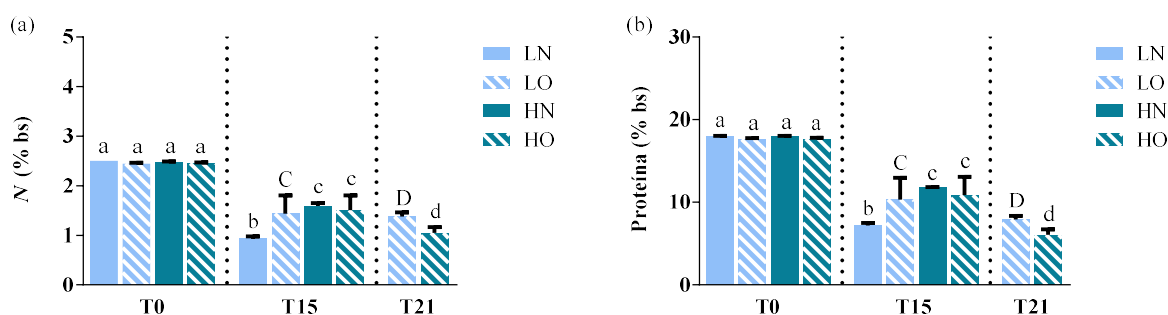


Figura 17. a) Teor de azoto e b) proteína, em percentagem de base seca, da *Ulva rigida* para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão; a, b, c, d letras diferentes indicam diferenças significativas; C, D letras maiúsculas em comum indicam diferenças significativas.

Relativamente às amostras recolhidas no tempo inicial (T0), os resultados obtidos referentes ao teor de azoto e proteína, para as condições LN, LO, HN e HO, variaram entre 2,4-2,5 e 17,6-18,0 % bs, respetivamente. Após quinze dias (T15) as mesmas condições apresentaram teores de azoto correspondentes a $0,9 \pm 0,0$, $1,4 \pm 0,4$, $1,6 \pm 0,1$ e $1,5 \pm 0,3$ % bs, respetivamente, e teores de proteína correspondentes a $7,2 \pm 0,3$, $10,3 \pm 2,7$, $11,8 \pm 0,0$ e $10,9 \pm 2,2$ % bs, respetivamente. Ao fim de vinte e um dias (T21), os teores de azoto para as condições LO e HO corresponderam a $1,4 \pm 0,0$ e $1,1 \pm 0,1$ % bs, respetivamente, e os teores de proteína corresponderam a $7,9 \pm 0,5$ e $6,1 \pm 0,7$ % bs, respetivamente.

Para facilitar a comparação entre os resultados com a literatura, calculou-se o teor médio de proteína em T0, T15 e T21 correspondente a $17,8 \pm 0,2$, $10,0 \pm 2,0$ e $7,0 \pm 1,3$ % bs, respetivamente. Numa primeira abordagem, os resultados obtidos evidenciaram uma diminuição do teor de azoto e/ou proteína, ao longo do tempo, para a *Ulva rigida* cultivada sob condições de cultivo específicas. Esta última tendência encontra-se de acordo com a maioria dos estudos descritos na literatura para diferentes espécies de *Ulva*. selvagens e submetidas a diferentes concentrações de nutrientes. De facto, Korzen *et al.* (102) ao avaliar o perfil de proteína e hidratos de carbono da *Ulva rigida* cultivada a diferentes distâncias de uma “gaiola” de peixe, verificaram uma diminuição do teor proteico com o aumento da distância ao local de cultivo dos peixes. Adicionalmente Msuya *et al.* (10) ao estudar o efeito de diferentes concentrações de nutrientes no perfil proteico de *Ulva lactuca*, cultivada em tanques exteriores, verificaram que a diminuição gradual da quantidade de nutrientes presentes no meio influenciou de forma negativa o teor proteico da alga, diminuindo de 43 % bs para 17 % bs. Desta forma, os resultados descritos na literatura sugerem que a diminuição gradual do teor de nutrientes no meio de cultivo das macroalgas induz uma menor incorporação de azoto e, consequentemente, uma menor síntese proteica (10,53,102). Apesar dos valores de proteína anteriormente descritos para as diferentes espécies de *Ulva* selvagens serem superiores aos valores de proteína obtidos, os resultados são comparáveis e sugerem que as condições estabelecidas para este desenho experimental provocaram uma diminuição do teor de azoto e/ou proteína mais acentuado comparativamente às condições estabelecidas pelos estudos referidos. No entanto, convém realçar a escassez de estudos que avaliem o perfil proteico da *Ulva rigida* cultivada em diferentes concentrações de nutrientes num sistema de IMTA.

Posteriormente, analisou-se de forma mais detalhada o efeito das diferentes condições de cultivo, separadamente, para o T0, T15 e T21. Em relação ao T0, os resultados evidenciaram-se idênticos entre as diferentes condições, dada a igual proveniência da *Ulva rigida* aquando do início do desenho experimental. Em T15, as diferenças significativas verificadas devem-se, essencialmente, ao baixo teor de proteína da condição LN em relação às restantes condições. Adicionalmente, os resultados indicaram que a diminuição do teor de azoto e/ou proteína, ao longo do tempo, sugere que os diferentes tipos de água utilizados neste desenho experimental, afetaram de certa forma a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo. De facto, os tanques repovoados com a menor densidade de cultivo possuem cerca de metade da quantidade de alga por m³, comparativamente aos tanques repovoados com a maior densidade de cultivo. Os tanques ao possuírem menos biomassa encontram-se mais vazios o que proporciona à alga um maior acesso aos nutrientes do que nos tanques com mais biomassa. Consequentemente, a alga eleva a sua taxa de crescimento devido ao maior acesso aos nutrientes, no entanto o crescimento gradual da alga resulta, por conseguinte, numa diminuição da concentração de nutrientes presentes no meio de cultivo. Este último raciocínio poderá explicar, hipoteticamente, o baixo teor de proteína na condição LN, em que o maior acesso aos nutrientes devido à baixa densidade de cultivo em T0 resultou num aumento do crescimento da alga e na diminuição da concentração de nutrientes no meio de cultivo, provocando uma condição de *stress* em T15 mais acentuada do que na condição HN. Contrariamente às condições LN e HN, nas condições LO e HO a DC não evidenciou um efeito tão acentuado, dado que a alga ao ser repovoada em T0 num meio com menor teor de nutrientes, o crescimento da alga foi menos acentuado, resultando numa situação de *stress* semelhante em ambas as condições.

Considerando que o tipo de água velha teria um efeito mais notório no perfil de proteína e, consequentemente, de hidratos de carbono comparativamente ao tipo de água nova, apenas as condições LO e HO foram mantidas mais uma semana (T21), visando compreender se de facto a densidade de cultivo poderia ou não influenciar este parâmetro. De facto, em T21 a densidade de cultivo não surtiu qualquer efeito significativo no teor proteico da *Ulva rigida*, permanecendo a dúvida se a condição LN seria capaz de reduzir ainda mais o teor proteico da alga. Atendendo ao objetivo empresarial e dado os resultados evidenciados pelas diferentes condições, separadamente, em T0, T15 e T21, sugere-se que a melhor combinação de condições que resultaria, possivelmente, num menor teor de

nutrientes no meio de cultivo e, por conseguinte, num menor teor proteico da *Ulva rigida* seria a condição com menor densidade conjugada com a água velha (LO). Esta última condição demonstrou-se efetivamente mais vantajosa em relação à condição HO, dado que com menor quantidade de biomassa (menor densidade) foi possível obter resultados semelhantes à elevada densidade. Adicionalmente, os resultados evidenciaram que o teor de proteína foi significativamente diferente e inferior entre a comparação das mesmas condições em T0 e T15. De facto, estas diferenças significativas demonstraram, mais uma vez, que o conteúdo de proteína em T15 e T21 diminuiu relativamente ao tempo inicial, sugerindo que o tempo foi, igualmente, um fator determinante para a alteração do conteúdo de azoto e/ou proteico da *Ulva rigida*.

Assim sendo, a ausência da renovação de água ao longo de todo o desenho experimental conjugado com os diferentes tipos de água originaram determinadas condições capazes de manipular o teor proteico da *Ulva rigida*. Nos primeiros quinze dias, a diminuição do conteúdo de proteína foi mais acentuada, verificando-se que a melhor combinação de condições capaz de manipular não só este conteúdo, como também promover à empresa uma melhor relação custo-benefício foi a LO.

3.2.4 Cor superficial

Tal como no primeiro desenho experimental, foram determinados os parâmetros de cor pertencentes ao espaço de cor CIE-L*a*b* e, posteriormente, o ΔE^* e o índice de acastanhamento (IA). Na Figura 18 estão representados os valores médios e respetivo desvio-padrão relativos aos parâmetros L*, a* e b* da *Ulva rigida*, para as quatro condições de cultivo LN, LO, HN e HO, no tempo inicial, após quinze e vinte e um dias.

Os valores médios de luminosidade (Figura 18 (a)) obtidos para as condições LN, LO, HN e HO em T0 variaram entre 61,4-62,8, respetivamente. As mesmas condições evidenciaram em T15 valores médios de luminosidade entre 62,7-68,8 e em T21, para as condições LO e HO, entre 69,4-64,4. Os resultados evidenciaram que em T0 e em T15 os valores de luminosidade foram idênticos entre as diferentes condições, à exceção do T21. Consequentemente, os resultados indicaram que as condições de cultivo, separadamente, em T0 e em T15, não influenciaram o parâmetro de luminosidade da *Ulva rigida* cultivada em condições específicas. No entanto, em T21 a *Ulva rigida* cultivada sob a condição HO evidenciou ser mais clara comparativamente à condição LO, devido ao menor valor de L* observado. De facto, a comparação da condição HO em T21 com o seu equivalente em T15

e T0 evidenciou diferenças significativas sugerindo que, ao longo do tempo, a *Ulva rigida* cultivada sob esta condição tornou-se mais clara relativamente ao início do desenho experimental.

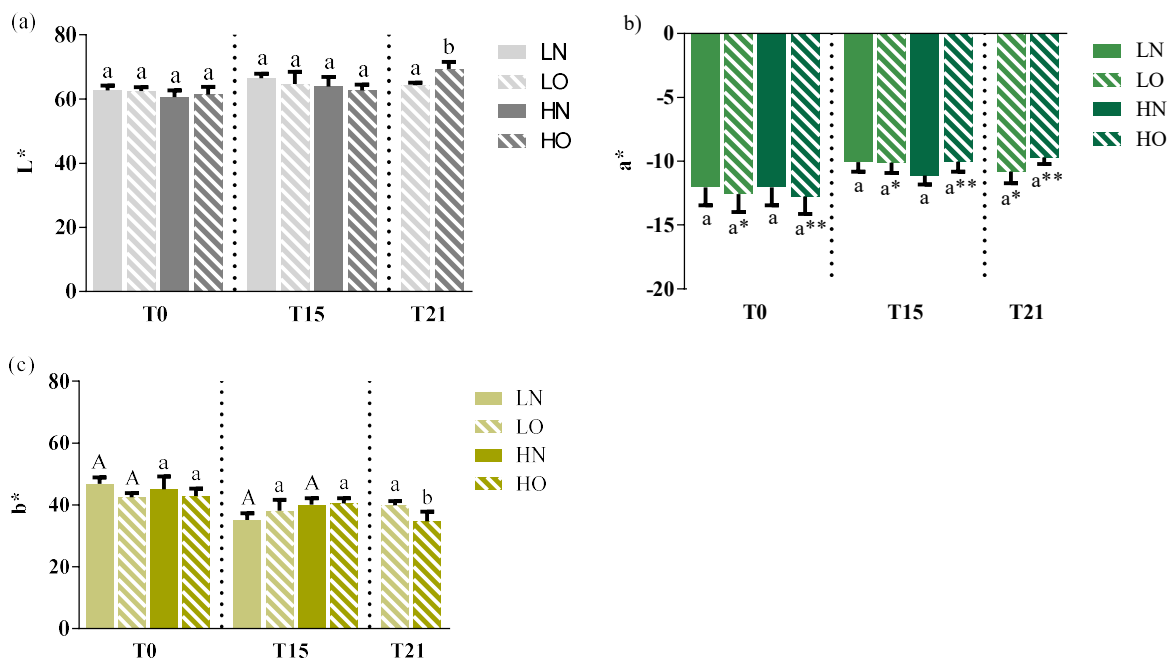


Figura 18. Valores médios e respetivo desvio-padrão dos parâmetros de cor a) L*, b) a* e c) b* da *Ulva rigida*, para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de seis medições \pm desvio-padrão; ^{a, b} letras diferentes indicam diferenças significativas; ^{A, A} letras maiúsculas em comum indicam diferenças significativas; *, ** condições com o mesmo número de asteriscos indicam diferenças significativas

Segundo a Figura 18 (b), os valores médios referentes à coordenada cromática a*, para as condições LN, LO, HN e HO, em T0 variaram entre -11,9–-13,4. Analogamente, as mesmas condições evidenciaram em T15 valores médios de a* compreendidos entre -9,7–-11,4 e em T21 entre -9,5–-10,8, respetivamente. Os resultados indicaram, tal como na luminosidade, que entre as diferentes condições de cultivo, separadamente, para o T0, T15 e T21, não existiram diferenças significativas quanto à coordenada cromática a*. Contudo, apesar do desvio-padrão associado, observou-se uma ligeira diminuição deste parâmetro em T15 e T21 comparativamente ao T0. De facto, a comparação efetuada entre as mesmas condições em tempos diferentes evidenciou que as condições LO e HO em T15 e T21 apresentaram, de forma significativa, um menor valor de a* em relação ao tempo inicial. Desta forma, os resultados sugerem que, de uma maneira geral, ao longo do tempo, ocorreu uma diminuição da cor verde da *Ulva rigida* nas diferentes condições de cultivo, no entanto

esta diferença de cor apenas se manifestou mais evidente nas condições LO e HO. De facto, as condições de cultivo, nomeadamente o tipo de água, aparenta influenciar a coloração verde da alga.

Quando ao parâmetro b^* , para as diferentes condições de cultivo, os resultados variaram em T0 entre 40,4-46,8, em T15 entre 34,4-40,5 e em T21 entre 34,8-39,9. Os resultados indicaram que em T0 e T15, de uma forma geral, o parâmetro b^* manteve-se, aproximadamente idêntico entre as diferentes condições, à exceção da condição LO em T0 e da condição LN em T15 que evidenciaram um valor de b^* relativamente mais baixo. Adicionalmente, a condição HO evidenciou um valor de b^* significativamente diferente da LO em T21 e dos seus equivalentes em T0 e T15. De facto, este menor valor de b^* associado à condição HO, ao longo do tempo, traduz-se numa coloração menos amarelada da *Ulva rigida* relativamente às restantes condições. Assim sendo, o efeito das diferentes condições de cultivo na cor superficial da *Ulva rigida* apenas foi mais notória nas condições testadas com o tipo de água velha, especialmente a HO que evidenciou uma tonalidade mais clara, menos verde e menos amarelada ao longo do tempo. O cultivo em água velha sugere que a menor disponibilidade de nutrientes, ao longo do tempo, condiciona o teor de proteína e, por sua vez, o teor de pigmentos fotossintéticos, tal como será evidenciado pelo cálculo do parâmetro ΔE^* .

Pela determinação dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , calculou-se o ΔE^* representado na Tabela 5, referente às comparações efetuadas entre as quatro condições de cultivo (LN, LO, HN e HO) para a *Ulva rigida*, no tempo inicial e após quinze e vinte e um dias. No subcapítulo 3.2.3, verificou-se que a menor disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo das macroalgas influenciou de forma negativa o seu teor de proteína. De acordo com Harrison *et al.* (35), os pigmentos fotossintéticos atuam como uma reserva de azoto na célula sendo gradualmente degradados quanto menor for a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo das algas. Desta forma, tendo em conta os dois tipos de água com diferentes concentrações de nutrientes, torna-se lógico que a condição que provoque uma menor disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo influenciará certamente o teor de pigmentos fotossintéticos na alga (103). Portanto, as diferenças de cor calculadas entre as condições de cultivo em tempos diferentes poderão relacionar-se, de certa forma, com o teor de proteína da alga, isto é, quanto maior for a diferença de proteína entre duas condições, maior será o ΔE^* .

Tabela 5. Valores de ΔE^* correspondentes às comparações efetuadas entre as diferentes condições de cultivo para a *Ulva rigida* em T0, T15 e T21.

Comparação	ΔE^*		
	T0	T15	T21
Igual DC e Diferente Tipo de Água			
LN vs. LO	4,70	6,26	-
HN vs. HO	2,31	1,84	-
Diferente DC e Igual Tipo de Água			
LN vs. HN	2,36	7,12	-
LO vs. HO	1,70	4,76	7,34
Mesmas Condições			
LN vs. LN	-	13,32	-
LO vs. LO	-	7,57	3,32
HN vs. HN	-	5,59	-
HO vs. HO	-	4,41	12,10
LO vs. LO	-	4,76	
HO vs. HO	-	8,81	

Primeiramente, procedeu-se à análise das diferenças de cor expressas pelo ΔE^* entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para o T0, T15 e T21. Desta forma, verificou-se que para o T0 a comparação entre as condições com igual densidade de cultivo e diferente tipo de água evidenciou, em média, maiores diferenças de cor comparativamente à comparação entre as condições com diferente densidade e igual tipo de água. Relativamente ao T15, a comparação entre as condições LN vs. LO e LN vs. HN evidenciaram as maiores diferenças de cor, dado o baixo teor proteico registado na condição LN associado à coloração menos verde. Além disso, a comparação entre as condições LO vs. HO registou igualmente uma diferença de cor apreciável contrariamente à comparação entre as condições HN vs. HO que registou a menor diferença de cor. Quanto ao T21, a única comparação entre as condições LO vs. HO evidenciou a maior diferença de cor relativamente às restantes analogias dada a elevada diferença entre os parâmetros L^* , a^* e b^* . Desta forma, as diferenças de cor calculadas entre as quatro condições de cultivo, separadamente, para o T0, T15 e T21 sugerem que a diferença de cor entre duas condições é tanto maior, quanto mais elevado for a diferença de proteína entre essas mesmas condições.

Adicionalmente, de modo a averiguar o efeito do tempo na diferença de cor, foram efetuadas comparações entre as mesmas condições em tempos diferentes. Os primeiros ΔE^* foram calculados para as mesmas condições entre T0 e T15, verificando-se que a comparação da condição LN evidenciou a maior diferença de cor, possivelmente devido à diminuição acentuada da proteína relativamente ao T0. As restantes comparações evidenciaram igualmente diferenças de cor consideráveis, mas não tão elevadas quanto a anterior. Contrariamente ao que seria esperado, o ΔE^* referente à comparação da condição LO entre T0 e T21 demonstrou-se inferior à comparação da condição LO entre T0 e T15, sugerindo que nem sempre a maior diferença no teor de proteína é indicativa de uma maior diferença de cor, dada o elevado erro associado à determinação dos parâmetros de cor. Contudo, a comparação da condição HO entre T0 e T21 evidenciou uma diferença de cor superior à comparação desta condição em T0/T15 e T15/T21 sugerindo que, neste caso, a elevada diferença de proteína entre T0 e T21 originou uma maior diferença de cor caracterizada pela maior claridade e coloração menos verde e menos amarelada.

Concluindo, a baixa disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo influenciou diretamente a concentração de pigmentos fotossintéticos e, por sua vez, a cor superficial das algas. De facto, ao longo do tempo, a menor disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo provocado pelos diferentes tipos de água, resultou numa menor concentração tecidual de azoto e num aumento da degradação de pigmentos fotossintéticos, o que, por sua vez, alterou a cor superficial da *Ulva rigida*. Esta alteração foi mais evidente nas condições testadas com o tipo de água velha, especialmente, na condição HO que originou uma *Ulva rigida* mais clara, menos verde e menos amarelada.

Adicionalmente, na tabela 6 estão representados os valores médios de IA, para as diferentes condições de cultivo, em T0, T15 e T21.

Tabela 6. Valores médios de índice de acastanhamento e respetivo desvio-padrão, da *Ulva rigida*, para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de três medições \pm desvio-padrão; ^{a, b} letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas

Condições	T0	T15	T21
LN	103,2 \pm 11,4 ^a	55,9 \pm 9,1 ^b	-
LO	84,1 \pm 6,9 ^a	72,5 \pm 10,3 ^b	74,7 \pm 4,5 ^b
HN	89,9 \pm 15,5 ^a	75,4 \pm 9,8 ^a	-
HO	87,5 \pm 11,7 ^a	80,7 \pm 8,0 ^a	57,3 \pm 6,1 ^b

Relativamente ao tempo inicial, as condições LO, HN e HO evidenciaram, em média, um IA idêntico, contrariamente à condição LN que se evidenciou superior. Após quinze dias, foi verificado para todas as condições uma diminuição do IA relativamente ao tempo inicial, sendo esta diminuição mais evidente na condição LN. Relativamente ao T21, foi verificado que para a condição LO, o IA permaneceu praticamente inalterado relativamente ao T15, no entanto na condição HO ocorreu uma diminuição do IA ainda mais notória. De uma maneira geral, entre as diferentes condições de cultivo não foram verificadas diferenças quanto ao IA, no entanto ao longo do tempo a diminuição do IA foi perceptível.

3.2.5 Lípidos totais e perfil de ácidos gordos

O procedimento de extração de ulvanas, conforme descrito no ponto 2.3.2 da secção de Materiais e Métodos envolveu, numa primeira fase, a extração por *Soxhlet* dos lípidos e pigmentos da *Ulva rigida*. A realização deste passo visou contribuir não só para o aumento do grau de pureza do extrato em causa, mas também para analisar a quantidade de lípidos totais presentes na amostra, assim como o seu perfil de ácidos gordos. Recentemente, alguns estudos (104,105) têm evidenciado que a depleção de nutrientes no meio de cultivo de algas induz alterações nas células ao nível metabólico, nomeadamente, diminuição da taxa fotossintética, atenuação do crescimento e uma gestão adequada do conteúdo de amido, lípidos e proteína durante o período de *stress*. De facto, sendo os lípidos compostos associados, principalmente, ao armazenamento de energia, alguns estudos têm sido realizados (106–108), sobretudo em microalgas, de modo a compreender se a depleção de nutrientes no meio de cultivo é suficiente para induzir a alteração da biossíntese de lípidos.

Desta forma, o conteúdo de lípidos totais foi determinado para as amostras HN (T0), HN (T15) e HO (T15) correspondendo a 1,8, 1,3 e 1,1 % bs, respetivamente. Dado que apenas foi realizada uma extração para cada amostra, os resultados devem ser considerados como uma aproximação ao teor de lípidos totais presentes na macroalga em estudo. Contudo, os resultados obtidos evidenciaram-se comparáveis aos descritos por Holdt *et al.* (18) que reportou um teor de lípidos totais entre 0,3-1,6 % bs para diferentes espécies pertencentes ao género *Ulva*. Paralelamente, os resultados indicaram que o teor de lípidos totais evidenciou-se, aproximadamente, idêntico entre as três amostras, sugerindo não só que o tempo de cultivo, assim como os dois tipos de água não influenciaram este parâmetro. Posteriormente, os perfis de ácidos gordos das três amostras foram analisados, encontrando-se representado, na Figura 19, apenas um dos cromatogramas referente à amostra HN (T0), dada a semelhança entre as amostras. No cromatograma estão assinalados os picos referentes à quantificação dos ácidos gordos representado na Tabela 7.

A análise dos cromatogramas representada na Tabela 7 evidenciou que as três amostras possuem o mesmo tipo de ácidos gordos, mas em diferentes proporções. Relativamente aos ácidos gordos saturados, o ácido palmítico revelou-se o mais abundante, para as três amostras, não só entre esta classe, como também dos ácidos gordos insaturados e os restantes derivados. Estes resultados encontram-se de acordo com os descritos por Kumari *et al.* (105), que ao testar a *Ulva lactuca* em diferentes concentrações de nutrientes, verificou que o ácido palmítico era o mais abundante entre as diferentes classes de ácidos gordos. Analogamente, os resultados evidenciaram uma diminuição significativa da concentração de ácido mirístico, palmítico e esteárico em T15 relativamente ao tempo inicial, permanecendo os restantes ácidos gordos saturados inalterados ao longo do tempo.

Quando aos ácidos gordos insaturados, os resultados indicaram que o ácido oleico foi o mais abundante entre os restantes ácidos gordos desta classe, seguido pelo ácido linolénico e palmitoleico. De uma forma geral, verificou-se uma diminuição significativa da concentração dos ácidos oct-3-enoico e octadeca-11-enoico em T15 relativamente ao T0, possivelmente, devido a alguma oxidação e/ou degradação da fração lipídica. Em contrapartida, o ácido eicosapentanoico e o docosahexaenoico foram os únicos a elevar a sua concentração de forma significativa, para as amostras HN e HO em T15, relativamente ao tempo inicial. Quanto ao ácido oleico, palmitoleico, linoleico, α -linolénico e o araquidónico não apresentaram alterações significativas, entre as três amostras, ao longo do tempo.

Relativamente aos restantes derivados dos ácidos gordos como os ésteres, os resultados evidenciaram na amostra HO, em T15, um aumento da concentração de 2-monopalmitina e 1-monopalmitina comparativamente às restantes amostras. Contudo para os álcoois de cadeia longa assim como para os diterpenos não se verificaram diferenças conclusivas, contrariamente aos esteróis derivados do colesterol que diminuíram de forma significativa ao longo do tempo. Paralelamente, a percentagem de ácidos gordos saturados e insaturados, ao longo do tempo, manteve-se idêntica entre as diferentes condições.

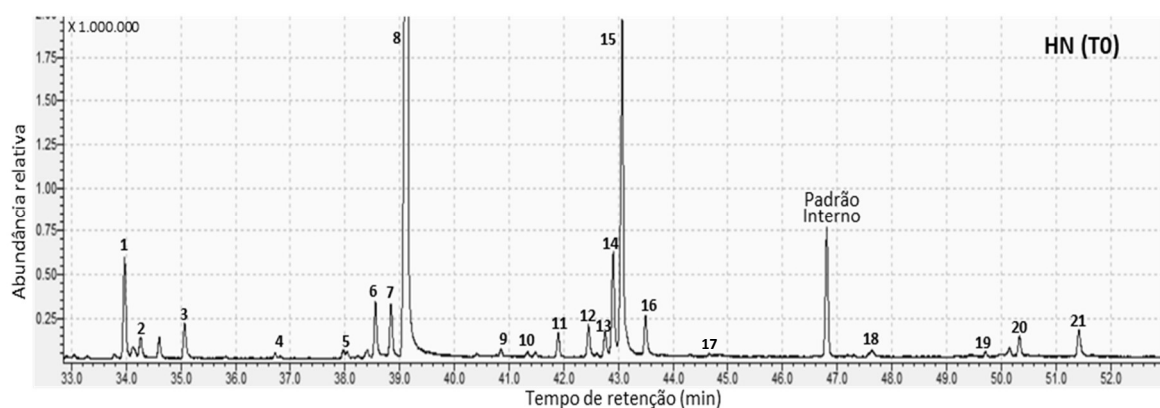


Figura 19. Representação do cromatograma referente ao perfil de ácidos gordos da condição HN, em T0, da *Ulva rigida*. Os números assinalados na figura referem-se aos ácidos gordos da Tabela 7.

Os resultados indicaram que, tendo em conta os ácidos gordos mais representativos da *Ulva rigida*, ocorreu uma diminuição da concentração de ácidos gordos saturados nas amostras HN e HO em T15 em relação ao tempo inicial. Adicionalmente, os ácidos gordos insaturados mais abundantes permaneceram nas três amostras, aproximadamente, na mesma concentração ao longo do tempo. Contudo, os ácidos gordos insaturados eicosapentanoico e docosahexaenoico aumentaram a sua concentração nas condições HN e HO, em T15, relativamente ao tempo inicial. De facto, as condições de cultivo, nomeadamente, os dois tipos de água, parecem induzir a alteração da concentração de ácidos gordos saturados diminuindo a sua concentração ao longo do tempo. No entanto, ao nível dos ácidos gordos insaturados, não se evidenciaram alterações notórias que permitam concluir que ao longo do tempo ocorre o aumento da insaturação dos ácidos gordos induzido pelas condições de cultivo. De facto, mais análises deveriam ser requeridas a estas amostras, como também às restantes de modo a averiguar se efetivamente ao longo do tempo ocorre a diminuição do teor de ácidos gordos saturados e o aumento da insaturação dos ácidos gordos provocada pela menor disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo.

Tabela 7. Concentração de ácidos gordos e derivados, em mg/Kg alga seca, das frações lipídicas correspondentes às amostras HN (T0), HN (T15) e HO (T15) para a *Ulva rigida*.

Os valores resultam da média de duas quantificações \pm desvio-padrão. ^{a,b,c} letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas.

		C (Ácido Gordo) mg/kg alga Seca		
Amostra		HN (T0)	HN (T15)	HO (T15)
Ácidos Gordos Saturados				
2	Ác. Tetradecanoico (mirístico)	59,5 \pm 1,0 ^a	33,7 \pm 0,3 ^b	42,6 \pm 5,5 ^b
4	Ác. Pentadecanoico	9,7 \pm 0,3 ^a	13,3 \pm 1,8 ^a	12,6 \pm 0,4 ^a
8	Ác. Hexadecanoico (palmítico)	4248,2 \pm 249,5 ^a	3087,1 \pm 290,7 ^b	3227,7 \pm 11,0 ^b
16	Ác. Octadecanoico (esteárico)	147,5 \pm 19,6 ^a	66,4 \pm 3,4 ^b	99,8 \pm 7,7 ^b
21	Ác. Docosanoico	97,5 \pm 19,8 ^a	90,6 \pm 0,8 ^a	112,5 \pm 2,4 ^a
18	Ác Eicosanoico	29,0 \pm 4,2 ^a	17,8 \pm 1,2 ^a	22,8 \pm 3,4 ^a
Ácidos Gordos Insaturados				
6	Ác. Hexadec-9-enoico (palmitoleico)	187,3 \pm 29,2 ^a	119,1 \pm 14,6 ^a	143,5 \pm 7,5 ^a
7	Ác. Oct-3-enoico	182,4 \pm 12,6 ^a	32,5 \pm 2,3 ^b	50,0 \pm 5,4 ^b
9	Ác. Heptadec-10-enoico	12,9 \pm 0,7 ^a	14,1 \pm 0,6 ^a	21,1 \pm 1,8 ^a
15	Ác. Oleico	1265,1 \pm 139,3 ^a	774,4 \pm 77,1 ^a	962,1 \pm 29,7 ^a
13	Ác Octadeca-9-12-dienoico (linoleico)	77,0 \pm 11,2 ^a	62,0 \pm 0,9 ^a	96,3 \pm 7,5 ^b
10	Ác. Octadec-11-enoico	19,0 \pm 1,8 ^a	3,5 \pm 0,2 ^b	14,2 \pm 0,3 ^c
14	Ác. α -linolénico	345,6 \pm 22,9 ^a	253,3 \pm 2,4 ^a	409,5 \pm 32,2 ^a
12	Ác. Eicosapentanoico	173,3 \pm 23,2 ^a	301,7 \pm 0,2 ^b	293,4 \pm 11,7 ^b
17	Ác. Araquidónico	9,7 \pm 1,3 ^a	10,3 \pm 2,0 ^a	13,1 \pm 1,5 ^a
5	Ác. Docosaheptaenoico	15,5 \pm 3,8 ^a	73,3 \pm 0,1 ^b	35,3 \pm 1,4 ^c
Ésteres de Ácidos Gordos				
19	2-Monopalmitina	8,8 \pm 0,8 ^a	9,3 \pm 1,4 ^a	19,9 \pm 1,9 ^b
20	1-Monopalmitina	61,5 \pm 1,7 ^a	76,1 \pm 4,4 ^a	92,3 \pm 0,5 ^b
Álcoois de Cadeia Longa				
3	Hexadec-2-en-1-ol	114,1 \pm 15,3 ^a	165,3 \pm 1,1 ^b	124,9 \pm 0,3 ^a
Diterpenos				
11	Fitol	87,5 \pm 7,0 ^a	34,6 \pm 1,4 ^b	44,5 \pm 0,4 ^c
1	Neofitadieno	323,9 \pm 36,8	471,5 \pm 19,5	317,7 \pm 8,7
Esteróis				
Derivados do Colesterol		689,3 \pm 26,7	139,8 \pm 2,5	212,6 \pm 4,9
Outros				
Hexadec-2-eno		32,6 \pm 1,2 ^a	33,8 \pm 4,2 ^a	25,6 \pm 1,2 ^a
Ág. Saturados (%)		66,5	66,6	63,0
Ág. Insaturados (%)		33,5	33,4	37,0

3.3. Análise de hidratos de carbono

De acordo com o segundo desenho experimental, um dos principais objetivos consistiu no estudo do perfil de hidratos de carbono da *Ulva rigida*, submetida a diferentes concentrações de nutrientes ao longo do tempo. Vários estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a acumulação de polissacarídeos de reserva aquando da exposição das macroalgas a baixas concentrações de nutrientes (102,109,110). Desta forma, pretendeu-se compreender se, de facto, o cultivo da macroalga *Ulva rigida* em água nova e água velha foi capaz de modular o conteúdo de hidratos de carbono, principalmente, de polissacarídeos de reserva.

3.3.1 Análise de açúcares neutros e ácidos urónicos

Numa primeira abordagem, procedeu-se à realização de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) à *Ulva rigida* seca e moída, de modo a avaliar a composição química dos polissacarídeos. Esta técnica permite, de uma forma simples e rápida, analisar os principais biopolímeros presentes nas macroalgas, dada a sua baixa solubilidade em álcool, porém ocorre igualmente a precipitação de outros componentes de elevado peso molecular, como as proteínas. Na Tabela 8 estão representados os rendimentos de AIR para a *Ulva rigida* cultivada em diferentes condições (LN, LO, HN e HO) ao longo do tempo.

Tabela 8. Rendimento de AIR, em percentagem de base seca, da *Ulva rigida*, para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN, e HO em T0, T15 e T21.

Condições	T0	T15	T21
LN	85,1	90,7	-
LO	85,8	85,6	87,0
HN	84,3	87,1	-
HO	83,0	88,2	88,0

Os resultados evidenciaram que no tempo inicial (T0), o rendimento de AIR foi idêntico entre as diferentes condições variando de 83,0-85,8 % bs. Contudo, após quinze dias (T15), os rendimentos de AIR referentes às condições LN, HN e HO apresentaram diferenças quantitativas superiores relativamente ao tempo inicial, variando entre 87,1-90,7 % bs, contrariamente à condição LO. Adicionalmente, o prolongamento do desenho experimental até aos vinte e um dias não afetou a quantidade de AIR obtida dado que foi idêntica comparativamente ao T15. De facto, as pequenas variações observadas ao nível do

rendimento de AIR entre as diferentes condições, ao longo do tempo, poderão ser explicadas com base na própria variação da composição físico-química da macroalga. Efetivamente, aquando da realização do AIR, tudo o que é solúvel em álcool e de baixo peso molecular, como os compostos de origem lipídica, pigmentos e açúcares livres, desaparece, permanecendo os compostos de maior peso molecular e com baixa solubilidade em álcool, como os polissacarídeos e as proteínas. Considerando as variações em termos nutricionais verificadas anteriormente (*i.e.*, proteína), estas juntamente com os restantes constituintes poderão originar uma ligeira alteração na quantidade de AIR obtido, sugerindo, novamente, a influência da composição físico-química das macroalgas neste parâmetro.

Seguidamente, a composição do AIR em termos de açúcares neutros e ácidos urónicos (UA) foi avaliada, de modo a compreender, numa primeira abordagem, o tipo de açúcares presentes na *Ulva rigida*. Na Figura 20 estão representados três cromatogramas representativos da condição HN em T0, T15 e T21 relativo à análise de açúcares neutros do AIR. Analogamente na Tabela 9 estão representados os teores de açúcares neutros, ácidos urónicos e açúcares neutros totais para as quatro condições de cultivo, ao longo do tempo.

Analisando, primeiramente, o teor de açúcares neutros, os resultados evidenciaram a presença, em diferentes proporções, de resíduos de ramnose (Rha), xilose (Xyl), galactose (Gal) e glucose (Glc), em todas as condições de cultivo, para o T0, T15 e T21. Em termos qualitativos, vários autores têm reportado, para diferentes espécies pertencentes ao género *Ulva*, uma composição em monossacarídeos idêntica à obtida para a *Ulva rigida* em estudo (76,111–113). Relativamente à Rha, Xyl e Gal, para as quatro condições de cultivo, estes resíduos variaram entre 6,9-7,9 % m/m, 1,9-2,5 % m/m e 0,4-0,6 % m/m, respetivamente, não se verificando diferenças significativas entre as diferentes condições de cultivo, ao longo do tempo. Contudo para a Glc, entre as quatro condições de cultivo, não se verificaram diferenças significativas, mas foi observado um aumento significativo da quantidade deste resíduo por g de AIR, sugerindo o enriquecimento da *Ulva rigida* em Glc ao longo do tempo.

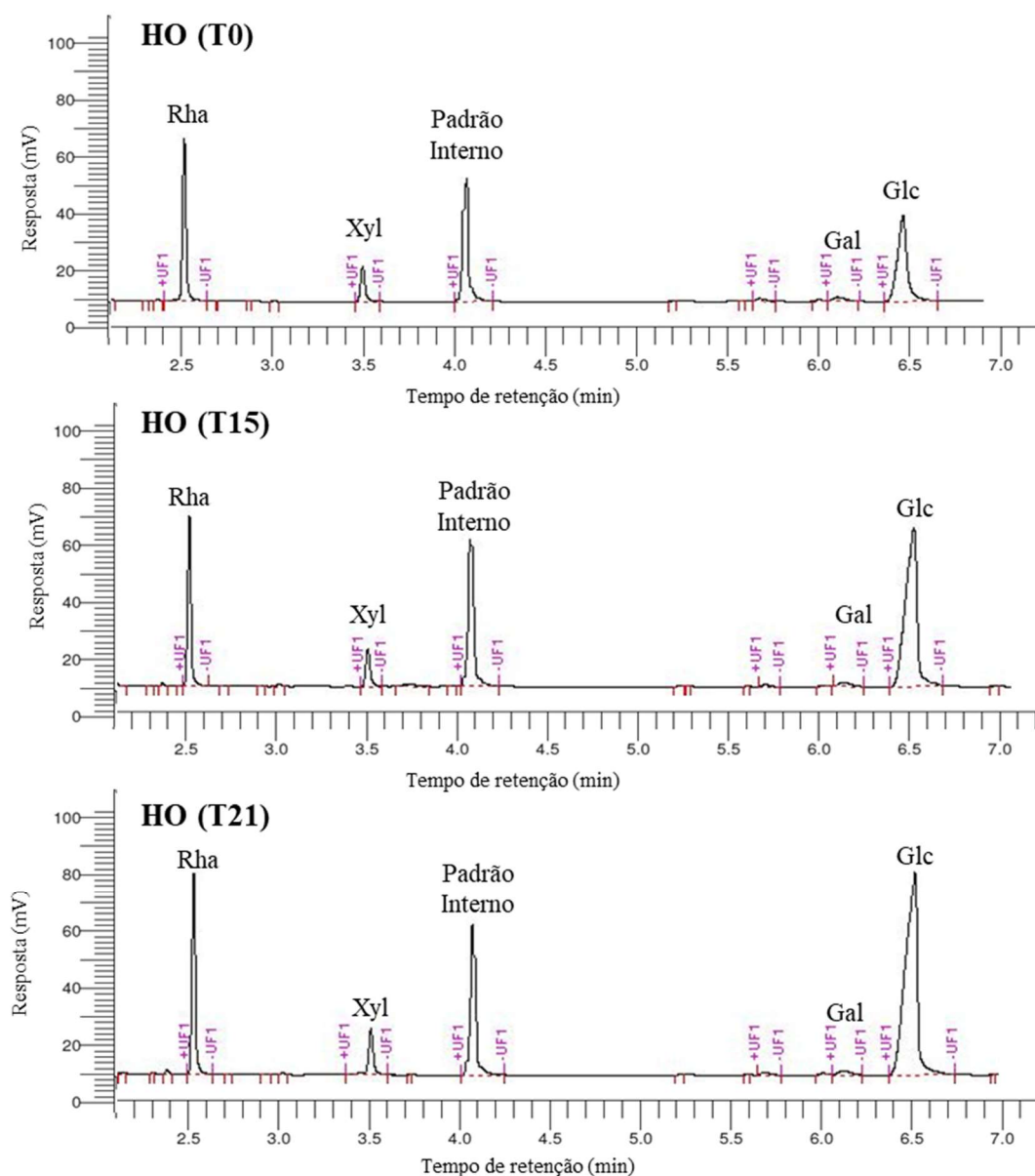


Figura 20. Representação cromatográfica da análise de açúcares neutros por GC-FID da *Ulva rigida* obtida pelo AIR da condição HO em T0, T15 e T21.

De facto, em T0, os resultados evidenciaram, um teor de Glc de, aproximadamente, 10 % m/m, contudo após quinze dias, este teor aumentou, correspondendo a 18,9-24,3 % m/m, respetivamente, e a 26,9-27,1 % m/m em T21. Alguns estudos realizados à *Ulva lactuca* verificaram a presença de vários açúcares neutros, nomeadamente, Rha (7-14 % m/m), Xyl (2-3 % m/m) e Glc (3-18 % m/m) e em quantidades minoritárias, a arabinose, manose e galactose (76,114). Desta forma, os resultados obtidos relativamente à Rha, Xyl, Gal e Glc

estão de acordo com os estudos anteriores, no entanto o teor de Glc da *Ulva rigida* em estudo atinge níveis mais elevados devido, possivelmente, às condições de cultivo utilizadas. De facto, as diferenças observadas quanto à composição em monossacarídeos em termos qualitativos e quantitativos, entre as várias espécies pertencentes ao género *Ulva*, dependem não só da própria espécie, mas também do período de recolha da alga, das condições de cultivo e da técnica implementada para extrair os polissacarídeos (77). Analogamente, a partir da quantificação dos diferentes açúcares neutros, foi possível calcular o teor de açúcares neutros totais que, devido ao aumento da Glc, aumentou significativamente ao longo do tempo. Quanto aos ácidos urónicos (UA) observou-se que, ao longo do tempo, estes mantiveram-se, aproximadamente, inalterados variando entre 17,9-23,4 % m/m, para as diferentes condições de cultivo, encontrando-se de acordo com a literatura (74).

Tabela 9. Teor de açúcares neutros, açúcares neutros totais, ácidos urónicos e polissacarídeos, em percentagem massa/massa, da *Ulva rigida* para as diferentes condições de cultivo LN, LO, HN e HO, em T0, T15 e T21.

Nota: os valores resultam da média de três quantificações \pm desvio-padrão. ^{a,b,c} letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas. Para cada parâmetro, os valores da primeira e segunda linhas estão expressos em função do AIR e da alga seca, respetivamente.

Tempo	T0				T15				T21	
Condições	LN	LO	HN	HO	LN	LO	HN	HO	LO	HO
Rha	7,3 ^a (6,2)	7,2 ^a (6,2)	6,9 ^a (5,8)	7,3 ^a (6,0)	7,9 ^a (7,2)	7,5 ^a (6,4)	7,1 ^a (6,2)	7,3 ^a (6,4)	7,5 ^a (6,6)	7,4 ^a (6,6)
Xyl	2,1 ^a (1,7)	1,9 ^a (1,7)	1,9 ^a (1,6)	2,0 ^a (1,6)	2,5 ^a (2,3)	2,2 ^a (1,9)	2,1 ^a (1,8)	2,2 ^a (1,9)	2,1 ^a (1,9)	2,3 ^a (2,0)
Gal	0,5 ^a (0,5)	0,5 ^a (0,5)	0,5 ^a (0,4)	0,4 ^a (0,4)	0,6 ^a (0,6)	0,6 ^a (0,5)	0,5 ^a (0,5)	0,6 ^a (0,5)	0,6 ^a (0,5)	0,5 ^a (0,5)
Glc	10,7 ^a (9,1)	10,8 ^a (9,3)	10,2 ^a (8,6)	10,8 ^a (9,0)	20,5 ^b (18,6)	23,9 ^b (20,4)	18,9 ^b (16,5)	24,3 ^b (21,5)	27,1 ^b (23,5)	26,9 ^b (23,7)
Açúcares Neutros Totais	20,6 ^a (17,6)	20,5 ^a (17,6)	19,5 ^a (16,4)	20,6 ^a (17,1)	31,5 ^b (28,6)	34,1 ^b (29,2)	28,7 ^b (25,0)	34,3 ^b (30,3)	37,4 ^b (32,5)	37,2 ^b (32,7)
UA	17,9 ^a (15,2)	20,7 ^a (17,8)	19,1 ^a (16,1)	20,7 ^a (17,2)	23,4 ^a (21,2)	21,2 ^a (18,2)	21,5 ^a (18,7)	21,2 ^a (18,7)	20,7 ^a (18,0)	21,3 ^a (18,7)
Polissacarídeos	38,7 ^a (32,8)	41,6 ^a (35,4)	38,8 ^a (35,6)	41,6 ^a (34,3)	55,1 ^b (49,8)	55,6 ^b (47,4)	50,4 ^b (43,7)	55,9 ^b (49,0)	58,3 ^b (50,5)	58,8 ^b (51,4)
Glc/Rha	1,5	1,5	1,5	1,5	2,6	3,2	2,7	3,4	3,6	3,6

Paralelamente, a quantificação simultânea dos açúcares neutros e dos ácidos urónicos permitiu calcular o teor de polissacarídeos em função do AIR e em função da alga em base seca. Ainda que esta determinação seja aproximada, os resultados evidenciaram que o teor de polissacarídeos presentes na *Ulva rigida* cultivada em diferentes concentrações de nutrientes variou entre 38,7-58,8 % m/m (AIR). De facto, em T0 o conteúdo de polissacarídeos manteve-se, aproximadamente, idêntico entre as diferentes condições de cultivo, no entanto, após quinze e vinte e um dias, este teor aumentou de forma significativa.

De acordo com a literatura, as algas verdes, particularmente, as espécies pertencentes ao género *Ulva* são constituídas por polissacarídeos da parede celular, nomeadamente, pelas ulvanas e, em menor quantidade, pela celulose, xiloglucanas e glucuronanas (74). Para além dos polissacarídeos da parede, estas algas são igualmente constituídas por polissacarídeos de reserva, como o amido. Sabendo que as ulvanas são constituídas, maioritariamente, por ramnose sulfatada, ácidos urónicos e xilose e dada a presença destes resíduos na *Ulva rigida* em estudo, os resultados sugerem a presença de ulvanas na amostra. Adicionalmente, considerando que a Glc é o monossacarídeo constituinte do amido e da celulose e tendo em conta a presença deste resíduo na amostra, os resultados sugerem que o aumento de Glc, ao longo do tempo, está maioritariamente associado à presença de amido, dado que o teor de celulose nesta alga é bastante baixo.

De facto, considerando a Rha e a Glc como os principais monossacarídeos constituintes das ulvanas e amido, respetivamente, foi estabelecida uma razão entre ambas de modo a compreender se, efetivamente, foi a Glc que aumentou ao longo do tempo. Sabendo que o teor de Rha manteve-se inalterado ao longo do tempo, verificou-se que em T0 a razão entre a Glc/Rha foi igual, para as diferentes condições, porém aumentou, aproximadamente, para o dobro em T15 e T21 devido à elevação do teor de Glc. Analisando, mais detalhadamente, a razão em T15, verificou-se que esta foi superior nas condições LO e HO (água velha) comparativamente às condições LN e HN (água nova), sugerindo que a água velha foi capaz de originar um maior *stress* nutritivo, resultando na elevação do conteúdo de Glc e, por sua vez, de amido. Comparando a razão Glc/Rha entre as mesmas condições em T15 e T21, verificou-se uma diferença muito menos evidente devido à semelhança do teor de Glc entre ambas, sugerindo que o prolongamento do desenho

experimental até aos vinte e um dias não se justificou, podendo obter-se resultados semelhantes apenas com duas semanas.

Paralelamente, vários estudos têm sido conduzidos em macro (115) e microalgas (103,107,108,116,117) no sentido de compreender o impacto das condições de cultivo, principalmente, do enriquecimento e/ou depleção de nutrientes no teor de polissacarídeos de reserva (amido). Para além disso, torna-se importante compreender de que forma é que a macroalga se adapta, metabolicamente, quando é submetida a diferentes concentrações de nutrientes, ou seja, que alterações ocorrem ao nível metabólico que induzam a síntese de amido neste tipo de condições. No entanto, os estudos atualmente realizados em micro e macroalgas não evidenciam de forma clara o mecanismo de adaptação pelo qual a alga sintetiza amido quando submetida a condições limitantes de nutrientes. Ainda assim, sabe-se que quando as algas são expostas, por um determinado período, a uma baixa concentração de nutrientes no meio, uma das primeiras respostas consiste na diminuição, ou mesmo, interrupção da divisão celular, resultando numa atenuação do crescimento (103). Simultaneamente, devido à diminuição gradual da concentração de nutrientes no meio de cultivo, ocorre não só uma diminuição da incorporação de azoto, como também uma diminuição das reservas de azoto na célula, maioritariamente na forma de pigmentos (35). Consequentemente, sugere-se que a maior disponibilidade de pigmentos para a realização da fotossíntese, resulta na fixação do CO₂ originando gliceraldeído-3-fosfato (G3P) pelo ciclo de Calvin, sendo este último composto, possivelmente, direcionado, na totalidade, para a síntese de amido, através da gluconeogénese e, posteriormente, pela enzima amido sintetase. A hipótese anteriormente sugerida, ocorre, de uma maneira geral, quando a alga é cultivada num meio sujeito a depleção de nutrientes. Contudo, neste desenho experimental, os diferentes tipos de água utilizados conjugados com a ausência de renovação, possivelmente, não foram suficientes para elevar, de forma tão notória, o teor de Glc (amido).

Desta forma, os resultados sugerem que a *Ulva rigida* é constituída, em parte, por ulvanas, devido à presença de Rha, Xyl e UA e, por amido, devido à presença de Glc. A razão estabelecida entre a Glc/Rha permite inferir que, ao longo do tempo, o teor de Glc aumenta, especialmente, nas condições testadas com água velha (LO e HO). De facto, a água velha parece potenciar o efeito de *stress* nutritivo comparativamente à água nova, no entanto este efeito não evidenciou ser suficiente de modo a originar o teor de amido desejado, uma vez que, *à priori*, a água da ria de Aveiro possui um elevado teor de nutrientes.

Adicionalmente, os resultados permitem concluir que qualquer uma das condições, LO ou HO, é passível de ser utilizada para obtenção de *Ulva rigida* com um maior teor de amido, sendo apenas necessário prolongar o desenho experimental até aos 15 dias.

3.3.2 Análise de ligações glicosídicas

A análise realizada anteriormente ao AIR evidenciou que a *Ulva rigida* cultivada sob diferentes concentrações de nutrientes, é constituída por ulvanas, devido à presença de resíduos de Rha, Xyl e UA. Deste modo, visando explorar, de forma mais detalhada, estes polissacarídeos da parede celular existentes nas algas verdes, realizou-se um processo de extração de ulvanas, não só para as quantificar, como também fazer uma caracterização da sua estrutura, determinando as ligações glicosídicas entre monossacarídeos e averiguar a posição dos grupos sulfato, através de uma análise de ligações glicosídicas antes e depois da dessulfatação.

Atendendo ao elevado número de amostras, devido às quatro condições de cultivo testadas em três tempos diferentes e dado o longo procedimento de extração de ulvanas, foram apenas selecionadas três amostras para análise, nomeadamente, uma em T0 (HN) e duas em T15 (HN e HO). De facto, a semelhança entre as diferentes condições ao nível da composição físico-química da *Ulva rigida* propiciou, em T0, a escolha de apenas uma condição, atuando como controlo, no entanto as alterações verificadas em T15 induziu a escolha de duas condições que possibilitassem a comparação entre a água nova e a água velha. Relativamente ao rendimento de extração das ulvanas, os resultados evidenciaram para as condições HN (T0), HN (T15) e HO (T15) rendimentos correspondentes a 39,4, 38,1 e 34,3 % bs, respetivamente. Estes resultados evidenciaram-se superiores aos obtidos por Costa *et al.* (113) e Alves *et al.* (84), tendo sido utilizado por estes autores o mesmo processo de extração. De realçar que o maior rendimento obtido comparativamente aos restantes estudos pode ser justificado pela maior quantidade de ulvanas existentes nesta espécie cultivada sob este regime, dado que, Lahaye *et al.* (74) verificaram que as condições de crescimento fisiológicas podem afetar não só a biossíntese de ulvanas, como também a sua composição físico-química. Além disso, supõe-se igualmente, que durante o processo de extração, pode ter ocorrido alguma precipitação de proteína, uma vez que, não foi utilizada proteinase K, tal como era requerido no procedimento. Paralelamente, foi determinada a quantidade de sulfatos nas amostras HN (T0), HN (T15) e HO (T15) correspondente a 24,5,

16,5 e 14,8 % bs, respetivamente. De facto, no tempo inicial o teor de sulfatos foi significativamente superior às restantes amostras, no entanto estes resultados encontram-se, em média, de acordo com os obtidos na literatura para diferentes espécies pertencentes ao género *Ulva* (10-20 % bs) (77,118).

Posteriormente, a análise de açúcares por metilação aos extratos de ulvanas da *Ulva rigida* submetida a condições de stress nutritivo permitiram identificar as ligações glicosídicas características destes polissacarídeos. A realização desta análise após a dessulfatação da amostra permitiu a identificação dos locais de ligação de ésteres de sulfato por comparação às ligações presentes na amostra sulfatada. Na Tabela 10 estão representadas as diferentes ligações glicosídicas obtidas para as amostras HN (T0), HN (T15) e HO (T15), assim como as respetivas dessulfatações (HN_DS e HO_DS).

Tabela 10. Ligações glicosídicas, em percentagem molar, das amostras submetidas a extração de ulvanas antes e depois da dessulfatação (T0 – HN, HN_DS; T15 – HN; HN_DS e HO; HO_DS).

Derivados metilados	Derivados de açúcar	T0		T15			
		HN	HN_DS	HN	HN_DS	HO	HO_DS
2,3-Me ₂ Xyl	4-Xyl	1,3	56,6	1,1	42,8	1,4	43,8
2-Me Xyl	3,4-Xyl	0,8	-	0,5	-	0,7	-
Xyl	2,3,4-Xyl	13,8	-	13,6	-	14,2	-
	Total	15,9	56,6	15,2	42,8	16,3	43,8
2,3,4-Me ₃ Rha	T-Rha	-	4,1	0,2	5,3	0,2	6,5
3-Me Rha	2,4-Rha	0,5	2,0	2,1	1,6	1,4	2,1
2-Me Rha	3,4-Rha	4,1	35,3	3,0	44,7	4,2	43,1
Rha	2,3,4-Rha	80,3	1,0	79,5	5,4	77,8	6,6
	Total	84,9	42,4	84,8	57,0	83,6	58,3

Primeiramente, a comparação das três amostras, sulfatadas e dessulfatadas, evidenciou a presença do mesmo tipo de ligações glicosídicas, aproximadamente, na mesma proporção. Este facto sugere que nas três amostras em estudo existem o mesmo tipo de polissacarídeos (ulvanas), tal como era esperado pela análise de açúcares efetuada ao AIR, que evidenciou para todas as amostras um teor de Rha, Xyl e UA muito semelhante. Paralelamente, as ligações glicosídicas obtidas estão de acordo com a maioria dos estudos (74,78,111,119)

tendo sido obtido por Barros *et al.* (111), a título de exemplo, 7,3 % mol e 1,8 % mol de 4-Xyl e 2,3,4-Xyl, respetivamente, e 29,5 % mol e 10,7 % mol 3,4-Rha e 2,3,4-Rha, respetivamente.

Relativamente à Xyl foram evidenciados, para as amostras sulfatadas, a presença em maior quantidade da ligação 2,3,4-Xyl e, em menor quantidade, da 3,4-Xyl e 4-Xyl. A ocorrência de 2,3,4-Xyl sugeriu que não ocorreu metilação em nenhum dos carbonos da Xyl o que pode ser, hipoteticamente, explicado tendo em conta a estrutura e/ou conformação das ulvanas. De facto, estes polissacarídeos são descritos por possuírem ácidos urónicos (GlcA e IdA) e sulfatos, o que confere à estrutura não só uma grande carga, como também uma conformação tridimensional complexa (74). Consequentemente, a possibilidade de ocorrência de sulfatos (SO_3^{2-}) no C-2 e C-3 da Xyl e a difícil acessibilidade do reagente metilante (CH_3I) devido à própria estrutura das ulvanas pode igualmente explicar o facto de não ter ocorrido metilação nestes carbonos, dado que após a metilação, ocorre a hidrólise dos sulfatos com ácido, acetilando estas posições. Quanto à presença, ainda que reduzida, da 4-Xyl, 3,4-Xyl e 2,3,4-Xyl sugerem que a ligação glicosídica entre a Xyl a resíduos adjacentes pode ser estabelecida entre o C-1 e o C-4. Adicionalmente, a ocorrência de 3,4-Xyl poderá indicar a presença de sulfatos no C-3 da Xyl, no entanto pode ser resultado apenas de uma inacessibilidade do reagente metilante. As amostras dessulfatadas evidenciaram um aumento considerável apenas da ligação 1,4-Xyl, tal como reportado por Lahaye *et al.* (78) verificando-se a ausência das restantes ligações. Desta forma, os resultados sugerem que a ligação glicosídica da Xyl ocorre entre o C-1 e o C-4 podendo este resíduo encontrar-se di-substituído por sulfatos no C-2 ou C-3 ou apenas num dos carbonos. De facto, a remoção dos sulfatos, ainda que incompleta, resulta numa maior acessibilidade do reagente metilante à Xyl, assim como poderá ficar com os C-2 e C-3 disponíveis devido à própria dessulfatação, ocorrendo metilação em todos os carbonos à exceção dos envolvidos na ligação glicosídica, fazendo assim aumentar o teor de 1,4-Xyl aquando da dessulfatação.

Relativamente à Rha, as amostras sulfatadas evidenciaram a presença, em grande quantidade, da ligação glicosídica 2,3,4-Rha e, em menor quantidade, da ligação T-Rha, 2,4-Rha e 3,4-Rha. A presença destes resíduos, numa primeira abordagem, sugere que a ligação glicosídica entre a Rha e os resíduos adjacentes é estabelecida entre o C-1 e o C-4. A ocorrência elevada de 2,3,4-Rha relativamente às restantes ligações poderá indicar, tal como na Xyl, a possível presença de sulfatos em ambas as posições. Analogamente, a ocorrência,

ainda que reduzida, das ligações 2,4-Rha e 3,4-Rha poderá igualmente ser indicativa da presença de sulfatos nos C-2 ou C-3, respetivamente. As amostras dessulfatadas evidenciaram um aumento significativo da ligação 3,4-Rha, contrariamente à ligação 2,4-Rha, que se manteve praticamente inalterada, e à 2,3,4-Rha que diminuiu significativamente. De facto, o aumento da ligação 3,4-Rha relativamente à amostra sulfatada é indicativo da presença de sulfatos no C-2, no entanto a persistência da ligação 2,4-Rha nas dessulfatadas poderá ser igualmente indicativa da presença de algum sulfato no C-3. Paralelamente, o aumento da ligação T-Rha relativamente às amostras sulfatadas poderá ser indicativo de alguma despolimerização dos polissacarídeos durante o processo de dessulfatação e/ou metilação. Desta forma, os resultados sugerem que a ligação glicosídica da Rha ocorre entre o C-1 e o C-4, podendo este resíduo encontrar-se di-substituído por sulfatos no C-2 ou C-3, especialmente no C-2 devido ao aumento significativo da ligação 3,4-Rha aquando da dessulfatação. De realçar que foi igualmente identificada a ligação 1,4-Glc nas amostras sulfatadas, possivelmente proveniente de algum amido remanescente.

Tendo em conta a literatura, os resultados sugerem que a maioria dos resíduos de Xyl possivelmente não se encontram sulfatados, podendo sugerir a presença na amostra dos dissacarídeos U_3S (Xyl-Rha3S) (111,119). Contudo os resultados revelaram que provavelmente o grupo sulfato na Xyl, pode ocorrer simultaneamente no C-2 e C-3. De facto, a ocorrência do sulfato no C-2 está descrita para a Xyl (78), no entanto não existem dados referentes à sua presença no C-3. Adicionalmente, a maioria dos estudos são indicativos da presença de Rha sulfatada no C-3, no entanto a análise de dessulfatação realizada evidenciou que as ulvanas extraídas estão especialmente sulfatadas no C-2. De facto, alguns estudos (79,120) têm reportado a presença de sulfatos no C-2 da Rha, no entanto poderá haver igualmente neste carbono a presença de GlcA. Desta forma, o facto da maioria das ulvanas descritas na literatura se encontrar sulfatada no C-3 da Rha há que ter em conta a elevada variabilidade entre as algas e a sua forma de cultivo, dado que podem influenciar a estrutura química dos polissacarídeos da parede celular (74). De realçar que, futuramente, mais análises seriam necessárias para confirmar a presença efetiva da maioria dos sulfatos no C-2 da Rha, assim como ajustar os procedimentos efetuados de modo a evitar possíveis perdas de resíduos.

4. Conclusão

As macroalgas são consideradas atualmente como superalimentos devido sobretudo à sua composição físico-química capaz de potenciar diversos benefícios para a saúde e bem-estar da população. Nos últimos anos, têm-se observado uma elevada procura de macroalgas dada a sua vasta utilização em diversas áreas, incluindo ao nível alimentar, tornando-se assim importante compreender de que forma o seu valor nutritivo pode ser melhorado. Desta forma, foram estabelecidos pela empresa ALGApplus Lda., dois desenhos experimentais, ambos pretendendo modular diferentes condições de cultivo de modo a verificar qual o seu impacto no perfil nutricional da alga verde *Ulva rigida*.

No primeiro desenho experimental, foram estabelecidas duas densidades de cultivo e duas taxas de renovação de água diferentes, originando no total quatro condições de cultivo diferentes (LN, LO, HN e HO), testadas em duas épocas sazonais diferentes, nomeadamente, verão (setembro) e inverno (janeiro). Os resultados permitiram concluir que o teor de humidade da alga seca e, consequentemente de resíduo sólido variaram entre 17,2-18,0 % bs e 82,0-87,8 % bs, respetivamente, em ambos os meses, evidenciando que ambos os parâmetros não foram afetados pelas diferentes condições de cultivo. Contudo, verificou-se que a acumulação do teor de cinzas na *Ulva rigida* foi influenciado de forma positiva pela DC, especialmente, pela baixa DC conjugada com uma baixa TR (LL), não se tendo verificado diferenças significativas entre o teor de cinzas médio em setembro (34 % bs) e janeiro (33 % bs). Paralelamente, os resultados permitiram concluir que o teor de proteína foi fortemente influenciado pela TR, tendo-se verificado o maior teor de proteína na condição HH, correspondendo em setembro 20,9 % bs e em janeiro a 23,5 % bs. De facto, a acumulação do teor de proteína na *Ulva rigida*, especialmente, no mês de janeiro (inverno) não surtiu efeito ao nível dos parâmetros de cor de luminosidade, no entanto de uma forma geral, as macroalgas cultivadas sob estas condições aparentaram em janeiro uma coloração menos amarelada do que em setembro.

Para o segundo desenho experimental, foram implementadas diferentes densidades de cultivo e tipos de água de modo a avaliar vários parâmetros, com especial foco no perfil de hidratos de carbono da *Ulva rigida*, cultivada por um período de três semanas. Os resultados permitiram concluir que as diferentes condições de cultivo não afetaram o teor de humidade, de resíduo sólido e de cinzas da *Ulva rigida*, cultivada ao longo do tempo, variando estes parâmetros entre 78-83 %, 17-23 % e 20-30 % bs, respetivamente. Em contrapartida, os que foi possível concluir que o teor de proteína foi afetado significativamente pelo tipo de água,

tendo-se verificado entre as diferentes condições de cultivo uma diminuição da concentração de proteína de 18-7 % bs ao longo do tempo. De facto, o tipo de água velha aparenta induzir uma menor concentração de nutrientes no meio de cultivo da *Ulva rigida* que altera não só o teor de proteína da alga, como também a sua cor superficial, tendo sido evidente para as condições LO e HO um aumento da claridade e diminuição da coloração verde ao longo do tempo de cultivo. Paralelamente, a análise do perfil de resíduos de açúcar da *Ulva rigida*, proveniente do AIR, evidenciou ser constituída, sobretudo por Rha (7-8 % m/m), Xyl (2-3 % m/m) UA (18-23 % m/m) referentes às ulvanas e por Glc (10-27 % m/m), referente ao amido. Os resultados permitiram concluir que, ao longo do tempo, o conteúdo de ulvanas permaneceu praticamente inalterado, no entanto o conteúdo de amido aumentou, tal como observado pelo aumento da razão Glc/Rha. De facto, o tipo de água velha, mais uma vez, tem um papel importante na acumulação de amido, sobretudo nas condições LO e HO, em que a disponibilidade de nutrientes no meio indica ser o fator decisivo na alteração da composição físico-química da macroalga. Adicionalmente, o estudo das ligações glicosídicas das ulvanas permitiu concluir que estas são constituídas por resíduos de Rha devido à presença das ligações T-Rha, 2,4-Rha, 3,4-Rha e 2,3,4-Rha e por Xyl devido à ocorrência das ligações 4-Xyl, 3,4-Xyl e 2,3,4-Xyl. Aquando da dessulfatação o aumento da 4-Xyl permitiu concluir que estes resíduos podem encontrar-se di-substituídos por sulfatos no C-2 e C-3 da Xyl. Em relação à Rha, as amostras dessulfatadas permitiram concluir que a ulvana em estudo poderá encontrar-se di-substituída por sulfatos no C-2 ou C-3, no entanto o aumento da ligação 3,4-Rha na dessulfatação sugere que esta está sobretudo substituída no C-2.

Em suma, os resultados deste trabalho permitiram concluir que, efetivamente, as condições de cultivo implementadas em ambos os desenhos experimentais foram capazes de modular a composição físico-química da *Ulva rigida* cultivada num sistema de IMTA. Desta forma, conclui-se que a modulação das condições de cultivo num sistema ambientalmente sustentável (IMTA) permite obter uma macroalga com diferentes composições físico-químicas, sendo esta diferença acentuada pelas variações sazonais. Esta alteração poderá tornar-se uma vantagem para a ALGApplus, Lda, na medida em que poderá comercializar no mercado uma macroalga com um melhor valor nutricional, potenciando simultaneamente os efeitos benéficos para a saúde e bem-estar da população.

5. Bibliografia

1. Abreu MH, Pereira R. Chapter 12: Marine Algae and the Global Food Industry. *Marine Algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. 1 ed. EUA: CRC Press; 2014; 300-319
2. Nwosu F, Morris J, Lund VA, Stewart D, Ross HA, McDougall GJ. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*. 2011;126(3):1006–12.
3. Orazio ND, Gemello E, Gammone MA, Girolamo M De, Ficoneri C, Riccioni G. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Marine Drugs*. 2012;1:604–16.
4. Teas J, Vena S, Cone DL. The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer: proof of principle. *Journal of Applied Phycology*. 2013;000:771–9.
5. Pereira L. Chapter: A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Seaweed: Ecology, nutrient composition and Medicinal uses*. 1 ed. EUA: Nova Science Publishers. 2011; 15-47.
6. Chopin T, Yarish C, Wilkes R, Belyea E, Lu S. Developing Porphyra / salmon integrated aquaculture for bioremediation and diversification of the aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*. 2000;463–72.
7. Chopin T. Seaweed Aquaculture Provides Diversified Products. Part II. Recent evolution of Seaweed. *Global Aquaculture Advocate*. 2014.
8. Matos J, Costa S, Rodrigues A, Pereira R, Pinto IS. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture*. 2006;252(289):31–42.
9. Abreu MH, Pereira R, Yarish C, Buschmann AH, Sousa-pinto I. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*. 2011;312(1–4):77–87.
10. Msuya FE, Neori A. Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*. 2008;20(6):1021–31.
11. Korzen L, Abelson A, Israel A. Growth, protein and carbohydrate contents in *Ulva rigida* and *Gracilaria bursa-pastoris* integrated with an offshore fish farm. *Journal of Applied Phycology*. 2016;1835–45.
12. Lee ER. *Phycology*. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2008.
13. Domínguez H. *Functional ingredients from algae for foods nutraceuticals*. 1 ed. Amsterdão: Elsevier. 2013.
14. Cardoso SM, Pereira OR, Seca AML, Pinto DCGA, Silva AMS. Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: from nutrients to functional foods. *Marine Drugs*. 2015;6838–65.
15. Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Reina GG, Ibá E. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51:450–5.

16. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(2):236–58.
17. Fleurence È, Physico-chimie Â, Qualite L. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Food Sciences & Technology*. 1999;10:26–9.
18. Holdt SL, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. 2011;543–97.
19. Macartain P, Gill CIR, Brooks M, Campbell R, Rowland IR. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*. 2007;535–43.
20. Honya M, kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K. Monthly determination of alginate, M/G ratio, mannitol and minerals in cultivated *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1993;59(2):295–9.
21. Mouradi-Givernaud A, Hassani LA, Givernaud T, Lemoine Y. Biology and agar composition of *Gelidium sesquipedale* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiologia*. 1999;391–5.
22. Tabarsa M, Rezaei M, Ramezanzpour Z, Waaland JR, Rabiei R. Fatty acids, amino acids, mineral contents, and proximate composition of some brown seaweeds. *Journal of Phycology*. 2012;292:285–92.
23. Polat M, Ozogu Y. Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2008;59:566–72.
24. Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*. 2004;85:439–44.
25. Lopes G, Sousa C, Andrade PB, Ferreres F. Sterol profiles in 18 macroalgae of the Portuguese coast. *Journal of Phycology*. 2011;1218:1210–8.
26. Rupérez P. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*. 2002;79:23–6.
27. Macartain P, Gill CIR, Brooks M, Campbell R, Rowland IR. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*. 2007;535–43.
28. Ortega-Calvo JJ, Mazuelos C, Hermosin B, Saiz-Jimenez. Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology*. 1993;425–35.
29. Shaw N, Liu Y. Bioavailability of iron from purple laver (*Porphyra spp.*) estimated in a rat hemoglobin regeneration Bioassay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000;48:1734–7.
30. Lobban CS, Harrison PJ. *Seaweed Ecology and Phycology*. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2000.

31. Black WAP. The seasonal variation in weight and chemical composition of the common British Laminariaceae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1950;29:45-72.
32. Adams JMM, Toop TA, Donnison IS, Gallagher JA. Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresource Technology*. 2011;102(21):9976–84.
33. Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Aberg P. Effects of UVB radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*. 1997;157:139–46.
34. Gorham J, Lewey SA. Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Marine Biology*. 1984; 80:103-107.
35. Harrison PJ, Hurd CL. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cahiers de Biologie Marine*. 2001;42(1–2):71–82.
36. Bischof KAI, Janknegt PJ, Buma AGJ, Rijstenbil JW, Peralta G, Breeman AM. Oxidative stress and enzymatic scavenging of superoxide radicals induced by solar UV-B radiation in *Ulva* canopies from southern Spain. *Scientia Marina*. 2003;67(3):353–9.
37. Bisschof K, Krabs G, Wiencke C. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*. 2002;502–9.
38. Targett NM, Arnold TM. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *Journal of Phycology*. 1998;205:195–205.
39. Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Gall AR. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*. 2004;47:410–6.
40. Swanson AK, Druehl LD. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic botany*. 2002;73:241–53.
41. Pérez-Rodríguez E, Aguilera J, Figueroa FL. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Marine Biology* 2001;633–9.
42. Cruces E, Huovinen P, Gómez I. Phlorotannin and antioxidant responses upon short-term exposure to UV radiation and elevated temperature in three south Pacific kelps. *Photochemistry and Photobiology*. 2012;88(1):58–66.
43. Dunlap WC, Shick JM. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology*. 1998;430:418–30.
44. Boderskov T, Schmedes PS, Bruhn A, Rasmussen MB, Nielsen MM, Pedersen MF. The effect of light and nutrient availability on growth, nitrogen, and pigment contents of *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) grown in outdoor tanks, under natural variation of sunlight and temperature, during autumn and early winter in Denmark. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(2):1153–65.

45. Barbara S, Hill C, Barbara S. Climate and recruitment of rocky shore intertidal invertebrates in the eastern North Atlantic. *Ecology*. 2008;89:81-90.
46. Werner FJ, Graiff A, Matthiessen B. Temperature effects on seaweed-sustaining top-down control vary with season. *Oecologia*. 2016;180(3):889–901.
47. Gao X, Endo H, Agatsuma Y. Effect of increased seawater temperature on biomass, growth, and maturation of *Saccharina japonica* near its southern limit in northern Japan. *Journal of Applied Phycology*. 2015;27(3):1263–70.
48. Kim JK, Kraemer GP, Neefus CD, Chung IK, Yarish C. Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (*Bangiales*, *Rhodophyta*) native to the New England coast. *Journal of Applied Phycology*. 2007;19(5):431–40.
49. Sze, P. A Biology of the algae. 1 ed. EUA: WCB/McGraw-Hill Companies. 1998.
50. Fleurence J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(1):25–28.
51. Stengel DB, Connan S, Popper ZA. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 2011;29(5):483-501.
52. Dean PR, Hurd CL. Seasonal growth, erosion rates, and nitrogen and photosynthetic ecophysiology of *Undaria pinnatifida* (Heterokontophyta). *Journal of Phycology*. 2007;1148:1138–48.
53. Figueroa FL, Israel A, Neori A, Martínez B, Malta E jan, Ang P, et al. Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): Responses to short-term stress. *Aquatic Biology*. 2009;7(1–2):173–83.
54. Lapoint BE, Duke CS. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light and nitrogen availability. *Journal of Phycology*. 1984;20:488-495.
55. Figueroa FL, Bueno A, Korbee N. Accumulation of Mycosporine-like Amino Acids in *Asparagopsis armata* Grown in Tanks with Fishpond Effluents of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2008;39(5):692–9.
56. Kumar M, Kumari P, Reddy CRK, Jha B. Salinity and desiccation induced oxidative stress acclimation in seaweeds. *Advances in Botanical Research*. 2014;71:91-123.
57. Martins I, Oliveira JM, Flindt MR, Marques JC. The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecologica*. 1999;20(4):259–65.
58. Choi TS, Kang EJ, Kim J, Kim KY. Effect of salinity on growth and nutrient uptake of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) from an eelgrass bed. *Algae*. 2010;25(1):17–26.
59. Murthy MS, Sharma CLNS. Salinity induced changes in peroxidase activity in the green seaweed *Ulva lactuca*. *Botanica Marina*. 1988;31:307–10.

60. Back S, Collins JC, Russel G. Comparative ecophysiology of Baltic and Atlantic. Marine Ecology Progress Series. 1992;84:71–82.
61. Kang YH, Kim S, Lee J. Nitrogen biofiltration capacities and photosynthetic activity of *Pyropia yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta): groundwork to validate its potential in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). Journal of Applied Phycology. 2013;26:947-955.
62. Bank W. FISH TO 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture. The World Bank. 2013.
63. Schuenhoff A, Shpigel M, Lupatsch I, Ashkenazi A, Msuya FE, Neori A. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. Aquaculture. 2003;221:167–81.
64. Neori A, Msuya FE, Shauli L, Schuenhoff A, Kopel F. A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. Journal of Applied Phycology. 2003;15:543–53.
65. Yang YF, Fei XG, Song JM, Hu HY, Wang GC, Chung IK. Growth of *Gracilaria lemaneiformis* under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters. Aquaculture. 2006;254(1–4):248–55.
66. Valente LMP, Gouveia A, Rema P, Matos J. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture. 2006;252:85–91.
67. Soler-vila A, Coughlan S, Guiry MD. The red alga *Porphyra dioica* as a fish-feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition. Journal of Applied Phycology. 2009;252:617–24.
68. Wassef EA, Masry MH El, Mikhail FR. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. Aquaculture Research. 2001;32(1):315–22.
69. Abreu MH, Varela DA, Henríquez L, Villarroel A, Yarish C, Sousa-pinto I, et al. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. Aquaculture. 2009;293(3–4):211–20.
70. Edding M, Fonck E, Acuna R. Cultivation of *Chondrus canaliculatus* (C. Agardh) greville (Gigartinales, Rhodophyta) in controlled environments. Aquaculture International. 2008;16:283–95.
71. Marinho GS, Holdt SL, Angelidaki I. Seasonal variations in the amino acid profile and protein nutritional value of *Saccharina latissima* cultivated in a commercial IMTA system. Journal of Applied Phycology. 2015;27:1991–2000.
72. Hofmann LC, Nettleton JC, Neefus CD, Arthur C. Cryptic diversity of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) in the great bay estuarine system (Atlantic USA): introduced and indigenous distromatic species. European Journal of Phycology. 2010;45:230-239.
73. Cao L. Immobilised enzymes: Science or art? Current opinion in chemical biology. 2005;9(2):217–26.

74. Lahaye M, Robic A. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules*. 2007;8(6):1765–74.
75. Lahaye M, Cimadevilla EA-C, Kuhlenkamp R, Quemener B, Lognoné V, Dion P. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 1999;11(1):1.
76. Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocolloids*. 2013;31(2):375–82.
77. Robic A, Sassi J-F, Dion P, Lerat Y, Lahaye M. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany Coast: Ulvan Variability. *Journal of Phycology*. 2009;45(4):962–73.
78. Ray B, Lahaye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. *Carbohydrate Research*. 1995;274:313–318.
79. Percival E, Wold JK. The acid polysaccharides from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The Site of the Ester Sulphate. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. The Royal Society of Chemistry. 1963;5459-5468.
80. Mokrzycki WS, Tatol M. Colour difference ΔE survey. *Machine Graphic & Vision*. 2012;8.
81. Moreira R, Chenlo F, Sineiro J, Arufe S, Sexto S. Drying temperature effect on powder physical properties and aqueous extract characteristics of *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(4):2485–94.
82. Mohammadi A, Rafiee S, Emam-Djomeh Z, Keyhani A. Kinetic models for colour changes in kiwifruit slices during hot air drying. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2008;4(3):376–383.
83. Cefola M, D'Antuono I, Pace B, Calabrese N, Carito A, Linsalata V. Biochemical relationships and browning index for assessing the storage suitability of artichoke genotypes. *Food Research International*. 2012;48(2):397–403.
84. Alves A, Caridade SG, Mano JF, Sousa RA, Reis RL. Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. *Carbohydrate Research*. 2010;345(15):2194–200.
85. Isca VMS, Seca AML, Pinto DCGA, Silva H, Silva AMS. Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*. 2014;165:330–6.
86. Selvendran RR, March JF, Ring SG. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Analytical biochemistry*. 1979;96(2):282–292.
87. Coimbra MA, Delgadillo I, Waldron KW, Selvendran RR. Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. *Plant cell wall analysis*. Springer; 1996;19–44.
88. Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*. 1984;131(2):209–217.

89. Miller IJ, Blunt JW. Desulfation of algal galactans. *Carbohydrate research*. 1998;309(1):39–43.
90. Hui YH, Nip WK. *Food biochemistry and food processing*. Ames, Iowa: Blackwell; 2006;769.
91. Khairy HM, El-Shafay SM. Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia*. 2013;55(2):435–52.
92. Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernández J, Bozzo C, et al. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*. 2006;99(1):98–104.
93. Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry*. 2011;129(2):491–8.
94. Lourenço SO, Barbarino E, De-Paula JC, Pereira LO da S, Marquez UML. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*. 2002;50(3):233–241.
95. Shuuluka D, Bolton JJ, Anderson RJ. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *Journal of Applied Phycology*. 2013;25(2):677–85.
96. Angell AR, Mata L, de Nys R, Paul NA. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(1):511–24.
97. Shuuluka D, Bolton JJ, Anderson RJ. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *Journal of Applied Phycology*. 2013;25(2):677–85.
98. Del Río MJ, Ramazanov Z, Garcia-Reina G. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. Fifteenth International Seaweed Symposium. Springer; 1996;61–66.
99. Neori A, Cohen I, Gordin H. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents. II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. *Botanica Marina*. 1991;34:483–489.
100. Cohen I, Neori A. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents. I. Ammonia Uptake Kinetics and Nitrogen Content. *Botanica Marina*. 1991;34:475–482.
101. Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 2006;97(18):2402–6.
102. Korzen L, Abelson A, Israel A. Growth, protein and carbohydrate contents in *Ulva rigida* and *Gracilaria bursa-pastoris* integrated with an offshore fish farm. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(3):1835–45.

103. Zhu S, Huang W, Xu J, Wang Z, Xu J, Yuan Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*. 2014;152:292–8.
104. Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 2006;45(2):160–86.
105. Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, Jha B. Nitrate and phosphate regimes induced lipidomic and biochemical changes in the intertidal macroalga *Ulva lactuca* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Plant and Cell Physiology*. 2014;55(1):52–63.
106. Takusagawa M, Nakajima Y, Saito T, Misumi O. Primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* accumulates storage glucan and triacylglycerol under nitrogen depletion. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2016;62(3):111–7.
107. Li Y, Han D, Sommerfeld M, Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum sp.* (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*. 2011;102(1):123–9.
108. Li T, Gargouri M, Feng J, Park J-J, Gao D, Miao C. Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*. 2015;180:250–7.
109. Smit AJ, Robertson BL, du Preez DR. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *Journal of Applied Phycology*. 1996;8(6):473–81.
110. Rosenberg C, Ramus J. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva sp.* (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Marine Biology*. 1982;66(3):251–259.
111. Barros AAA, Alves A, Nunes C, Coimbra MA, Pires RA, Reis RL. Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(11):9086–97.
112. Toskas G, Hund R-D, Laourine E, Cherif C, Smyrniotopoulos V, Roussis V. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida*. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(3):1093–102.
113. Costa C, Alves A, Pinto PR, Sousa RA, Borges da Silva EA, Reis RL, et al. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88(2):537–46.
114. Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*. 2011;128(4):895–901.
115. Korzen L, Abelson A, Israel A. Growth, protein and carbohydrate contents in *Ulva rigida* and *Gracilaria bursa-pastoris* integrated with an offshore fish farm. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(3):1835–45.
116. Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*. 2011;88(10):3331–5.

117. Yao C, Ai J, Cao X, Xue S, Zhang W. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*. 2012;118:438–44.
118. Robic A, Gaillard C, Sassi J-F, Lerat Y, Lahaye M. Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*. 2009;91(8):652–64.
119. Lahaye M, Ray B. Cell-wall polysaccharides alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta)–NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 1996;283:161-173.
120. Wang L, Wang X, Wu H, Liu R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*. 2014;12(9):4984–5020.

